



**T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**HÜCRESEL ETKİLEŞİMLERİNİN İNCELENMESİ İÇİN
DİPEPTİT TEMELLİ NANOPARTİKÜLLERİN
HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

DOKTORA TEZİ

Burcu ÖNAL ACET

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet ODABAŞI**

AKSARAY, 2024

Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 192322001 numaralı Doktora öğrencisi Burcu ÖNAL ACET tarafından hazırlanan “HÜCRESEL ETKİLEŞİMLERİNİN İNCELENMESİ İÇİN DİPEPTİT TEMELLİ NANOPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Kimya Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Mehmet ODABAŞI

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye: Prof. Dr. M. Hüseyin ALKAN

Dicle Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye: Prof. Dr. Gözde BAYDEMİR PEŞİNT

Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye: Prof. Dr. Talat BARAN

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye: Doç. Dr. Tülden İNANAN

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Tez Savunma Tarihi: 22/10/2024

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Prof. Dr. Fazliye KARABÖRK

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

DOĞRULUK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, akademik kurallara ve bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu, çalışmamda kullandığım verilerin orijinalliğini ve her türlü intihalden uzak olduğunu beyan ederim.

Enstitü tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

Burcu ÖNAL ACET



TEŞEKKÜR

Bilime ve hayata bakış açısı ile bizlere ışık tutan ve bu çalışmanın yürütülmesi sırasında desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Mehmet ODABAŞI'na,

Tez İzleme Komitemde engin bilgilerinden her zaman faydalandığım Prof. Dr. M. Hüseyin ALKAN'a, Doç. Dr. Tülden İNANAN'a,

Tez Savunma Komitemde yer alan desteklerine minnettar olduğum Prof. Dr. Gözde BAYDEMİR PEŞİNT'e ve Prof. Dr. Talat BARAN'a teşekkür ederim.

Öğrenimim boyunca gerek bilgisi gerek tecrübesi ile bana her zaman destek olan eşim Doç. Dr. Ömür ACET'e ve doğacak kızım Ada'ya hep minnettar olacağım.

Hayatım boyunca her konuda yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen anneme, babama, kardeşlerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Desteklerinden ötürü laboratuvar arkadaşlarım Dr. Emrah DİKİCİ'ye, Tuba GÖK'e,

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) Uluslararası İkili İşbirliği Projeleri kapsamında (Hibe Numarası: 220N178) ve 2214 Yurtdışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı kapsamında desteklenmiştir. Tezimin gerçekleşmesinde maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Burcu ÖNAL ACET

AKSARAY, 2024

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1 Nanomateryaller	4
2.1.1 Nanomateryal dizaynı, seçimi ve önemi.....	6
2.2 Peptit Temelli Nanomateryaller	7
2.3 Self Assembly.....	8
2.4 Peptitlerde Self Assembly Mekanizması.....	10
2.5 Dipeptitler.....	12
2.6 Bottom up ve Top Down Stratejileri	15
2.7 Protein-Korona ve Nanomateryal Etkileşimleri	16
2.8 Dipeptitlerin Kullanım Alanları	19
2.9 Dipeptit NM'lerin Kanserdeki Rolü ve siRNA Mekanizması	21
2.10 Eksozomlar	24
2.10.1 Eksozomlar ve biyokorona	27
2.11 Eksozom İzolasyonu ve Saflaştırılmasına Yönelik Stratejiler ve Teknolojiler.....	28
2.11.1 Eksozomal biyogenez	28
2.11.2 Yaygın eksozomal ayırma teknikleri.....	29
2.11.2.1 Ultrasantrifüjleme	29
2.11.2.2 Ultrafiltrasyon	30
2.11.2.3 Boyut ayırma kromatografisi	31
2.11.2.4 İmmünoafinite.....	31
2.11.2.5 Polimer çöktürmesi	32
2.11.2.6 Eksozom ayırma kitleri	32
2.11.3 Gerçek ve büyük ölçekli üretim.....	33
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	35
3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar	35
3.2 Peptit Temelli Nanomateryallerin Sentezi	35
3.3 Peptit Temelli Nanomateryallerin Karakterizasyonu	38
3.3.1 Taramalı elektron mikroskobu (SEM).....	38
3.3.2 Geçirimli elektron mikroskobu (TEM).....	38
3.3.3 MS analizleri.....	38
3.3.4 Dinamik ışık saçılması (DLS) analizleri.....	39
3.3.5 Zayıflatılmış toplam yansıma-fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi (ATR-FTIR) analizleri.....	39
3.4 Fmoc-Lys NM'lere Ca ²⁺ İyonlarının Bağlanması	39
3.5 Fmoc-Lys NM'lerin HSA, IgG ve DNA ile Etkileşimleri.....	40
3.6 MTT Deneyleri Kullanılarak Tümör Hücrelerine Karşı Fmoc-Lys NM'lerin Sitotoksitesinin Analizi	41
3.7 siRNA'nın Fmoc-Lys, Fmoc-Lys-Ca ²⁺ Nanomateryalleri ile Komplekslerinin Zeta Potansiyel Ölçümleri.....	42

3.8 Agaroz Jel Elektroforez	42
3.9 Flow Sitometri ile NM-siRNA'nın HT-29 ve HeLa Kanser Hücrelerine Alınması	43
3.10 Tümör Hücrelerine Karşı Fmoc-Lys NM ile siRNA Komplekslerin Sitotoksitesinin Analizi	44
3.11 Eksozom Çalışmaları için Kullanılan Hücre Kültürü	44
3.12 Diferansiyel Ultrasantrifüjleme ile Eksozom İzolasyonu	45
3.13 Eksozomlar ve Fmoc-Lys NM'lerin Etkileşim Çalışmaları	45
3.14 Kolloidal Stabilité Çalışmaları	46
3.15 Hücre Canlılığı Çalışmaları	47
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	48
4.1 Peptit Temelli Nanomateryallerin Sentezi ve Karakterizasyonu	48
4.2 Fmoc-Lys NM'lere Ca^{+2} İyonlarının Bağlanması	53
4.3 Fmoc-Lys NM'lerin HSA, IgG ve DNA Biyomolekülleri ile Etkileşimleri ...	55
4.4 Fmoc-Lys NM'lerin Tümör Hücrelerine Karşı Sitotoksité Analizi	57
4.5 siRNA'nın Fmoc-Lys, Fmoc-Lys- Ca^{2+} Nanomateryalleri İle Komplekslerinin Zeta Potansiyel Ölçümleri	58
4.6 siRNA'nın Fmoc-Lys, Fmoc-Lys- Ca^{2+} Nanomateryalleri İle Komplekslerinin Agaroz Jel Elektroforez Ölçümleri	60
4.7 Akış Sitometrisi ile NM-siRNA'nın HT-29 ve HeLa Kanser Hücrelerine Alınması	61
4.8 Tümör Hücrelerine Karşı Fmoc-Lys NM ile siRNA Komplekslerin Sitotoksitesinin Analizi	62
4.9 Eksozomlar ve Fmoc-Lys NM'lerin Etkileşim Çalışmaları	64
4.10 Kolloidal Stabilité Çalışmaları	67
4.11 Fmoc-Lys-Exo Yapılarının Karakterizasyonu	68
4.12 Hücre Canlılığı Çalışmaları	69
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	75
KAYNAKLAR	78
ÖZGEÇMİŞ	102

DOKTORA TEZİ

HÜCRESEL ETKİLEŞİMLERİNİN İNCELENMESİ İÇİN DİPEPTİT TEMELLİ NANOPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Burcu ÖNAL ACET

**Aksaray Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı**

Danışman: Prof. Dr. Mehmet ODABAŞI

ÖZET

Benzersiz kimyasal, fiziksel ve biyolojik özellikleri, sentez ve işlevsellik kolaylığı ve doğal biyouyumlulukları sayesinde peptit bazlı nanomateryaller son derece dikkat çekici olup kendiliğinden düzenlenen nanomateryaller, çeşitli biyomedikal uygulamalar için yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Biyolojik olarak parçalanabilir, toksik olmamaları ve birçok ilacı kanser hücrelerine verimli bir şekilde taşıma yeteneğine sahiptir. Bu çalışma kapsamında öncelikle N-(florenilmetoksikarbonil)-L-lizin (Fmoc-Lys) nanomateryaller (NM'ler) sentezlendi ve karakterize edildi. Daha sonra hücre toksisitesi ve hücre içselleştirme testleriyle devam edildi. Sonuçlar, Fmoc-Lys-siRNA'nın Mcl-1 ekspresyonunu ve BCL-2 ekspresyonunu inhibe edebildiğini, dolayısıyla kanser hücrelerine taşınmanın ardından kanserli hücrenin apoptozuna yol açabildiğini gösterdi. Bu nedenle bu çalışma, yeni bir anti-kanser ajanı (Fmoc-Lys-siRNA-Mcl-1) hazırladığı için gelecekte kanser tedavisi için araçlar sunmaktadır.

Hücre dışı kesecikler olan eksozomlar, çapı 30 ila 150 nm olan ve fizyolojik koşullar altında negatif yüke sahip olan yapılardır. Bazı proteinlerin ve biyolojik bileşiklerin sulu ortamlarda eksozomlara bağlanarak protein korona katmanı oluşturduğu öne sürülse de, biyoakışkanlarda protein korona oluşumuna katkıda bulunan faktörlerin anlaşılması sınırlı kalmaktadır. Bu amaçla, protein koronanın eksozomun nanomateryal toksisitesi üzerindeki etkilerini araştırmaya yönelik çalışıldı. NM'lerin eksozomlarla etkileşim çalışmaları da yapıldı. Ayrıca, model kanser hücrelerinden elde edilen eksozomlar kullanılarak hücre canlılığı deneyleri yapıldı. Ek olarak Fmoc-Lys NM'lerin koloidal stabilitesi de araştırıldı. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda Fmoc-Lys-Exo yapılarının biyokorona oluşturduğu ve toksisiteyi azalttığı gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Dipeptit Nanomateryaller, Eksozom, Fmoc-Lys, siRNA, Kanser, Sitotoksosite.

Ekim, 2024; 103 sayfa

PhD. THESIS

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF DIPEPTIDE-BASED NANOPARTICLES FOR THE STUDY OF THEIR CELLULAR INTERACTIONS

Burcu ÖNAL ACET

**Aksaray University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry**

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet ODABAŞI

ABSTRACT

Thanks to their unique chemical, physical and biological properties, ease of synthesis and functionality, and inherent biocompatibility, peptide-based nanomaterials are extremely remarkable, and self-assembled nanomaterials are being intensively investigated for various biomedical applications. They are biodegradable, nontoxic, and have the ability to efficiently transport many drugs to cancer cells. Within the scope of this study, N-(fluorenylmethoxycarbonyl)-L-lysine (Fmoc-Lys) nanomaterials (NMs) were synthesized and characterized. It was then continued with cell toxicity and cell internalization tests. The results showed that Fmoc-Lys-siRNA could inhibit Mcl-1 expression and BCL-2 expression, thus leading to apoptosis of the cancerous cell after transport to cancer cells. Therefore, this study provides tools for future cancer treatment as it prepared a new anti-cancer agent (Fmoc-Lys-siRNA-Mcl-1).

Exosomes, extracellular vesicles, are structures that are 30 to 150 nm in diameter and have a negative charge under physiological conditions. Although it has been suggested that some proteins and biological compounds bind to exosomes in aqueous environments to form protein corona layers, understanding of the factors contributing to protein corona formation in biofluids remains limited. For this purpose, an effort was made to investigate the effects of protein corona on the nanomaterial toxicity of the exosome. Interaction studies of NMs with exosomes were also performed. Additionally, cell viability experiments were performed using exosomes obtained from model cancer cells. Additionally, the colloidal stability of Fmoc-Lys NMs was also investigated. In line with the results obtained, it was observed that Fmoc-Lys-Exo structures formed biocorona and reduced toxicity.

Keywords: Dipeptide Nanomaterials, Exosome, Fmoc-Lys, siRNA, Cancer, Cytotoxicity.

October, 2024; 103 pages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Farklı sınıflardaki nanomateriyaller.....	4
Şekil 2.2. Dipeptit nanomateriyallerin üstün özellikleri.	12
Şekil 2.3. Nanomateriyallerin sentez yaklaşımları.....	15
Şekil 2.4. Anti-apoptotik proteinlerin düzenlenme mekanizması.....	22
Şekil 2.5. siRNA nanomateriyal dağıtım sistemi.	24
Şekil 2.6. Eksozom yapısı.	24
Şekil 3.1. NM 'lerin oluşum aşamaları.	36
Şekil 3.2. Fmoc-Lys NM'lerin oluşumu.	37
Şekil 3.3. Hücre canlılığının MTT reaktifi kullanılarak analizi.....	41
Şekil 3.4. Kanseri hücre hattından eksozom izolasyonu.....	45
Şekil 4.1. Farklı GA oranlarında ve 2 saatlik çapraz bağlanma süresi ile sentezlenen Fmoc-Lys NM'lerin SEM görüntüleri.....	48
Şekil 4.2. Farklı GA oranlarında ve 4 saatlik çapraz bağlanma süresi ile sentezlenen Fmoc-Lys NM'lerin SEM görüntüleri.....	48
Şekil 4.3. Farklı GA oranlarında ve 6 saatlik çapraz bağlanma süresi ile sentezlenen Fmoc-Lys NM'lerin SEM görüntüleri.....	48
Şekil 4.4. 0,9 ml GA varlığında ve 4 saatlik çapraz bağlanma süresinde sentezlenen Fmoc-Lys NM'lerin SEM görüntüleri (sonikasyonsuz (A); sonikasyonlu (B)).	49
Şekil 4.5. 0,9 ml GA varlığında ve 4 saatlik çapraz bağlanma süresinde sentezlenen Fmoc-Lys NM'lerin SEM görüntüleri (A); ImageJ ile yapılan boy dağılım analizi (B).....	50
Şekil 4.6. Fmoc-Lys NM'lerin DLS analizleri.	50
Şekil 4.7. Fmoc-Lys NM'lerin SEM (A) ve TEM (B) görüntüleri.....	51
Şekil 4.8. Monomer Fmoc-Lys molekülünün kütle spektroskopisi analizi	51
Şekil 4.9. Fmoc-Lys NM'nin 4 saat GA ile muamele edilip sulu ortamda kendi kendine düzenlenme sonrası alınan kütle spektroskopisi analizi.....	52
Şekil 4.10. Fmoc-Lys NM (A), monomer Fmoc-Lys (B) ve GA'nın (C) ATR-FTIR spektrumları.	52
Şekil 4.11. Fmoc-Lys NM'lerin çeşitli Ca(NO ₃) ₂ konsantrasyonlarda alınmış Zeta potansiyelleri	54
Şekil 4.12. Fmoc-Lys NM'ler ve Ca ²⁺ iyonları arasındaki olası etkileşim modeli....	54
Şekil 4.13. Fmoc-Lys-Ca ²⁺ NM'lerin farklı biyomoleküllerle korona yapılarının Zeta potansiyelleri.....	57
Şekil 4.14. 45,5 µg/mL ve 72,0 µg/mL konsantrasyonlarda 24 (A) ve 72 (B) saat boyunca Fmoc-Lys, Fmoc-Lys-Ca ²⁺ NM'ler ile inkübasyondan sonra canlı HeLa hücrelerinin yüzdesi.....	57
Şekil 4.15. 12,5 µg/mL ve 22 µg/mL konsantrasyonlarda 24 (A) ve 72 (B) saat boyunca Fmoc-Lys NM'ler ile inkübasyondan sonra canlı HT-29 hücrelerinin yüzdesi.	58
Şekil 4.16. siRNA'nın farklı konsantrasyonlarda Fmoc-Lys ve Fmoc-Lys-Ca ²⁺ nanomateriyalleri ile etkileştiği elektroforegram sonuçları.....	60
Şekil 4.17. Farklı konsantrasyonlarda Fmoc-Lys ve Fmoc-Lys-Ca ²⁺ NM'lerin siRNA ile komplekslerinin HT-29 (A) ve HeLa (B) hücrelerine girmesi.....	61
Şekil 4.18. siMcl-1 (A) ve siBcl-xL (B) varlığında ve yokluğunda Fmoc-Lys ve Fmoc-Lys-Ca ²⁺ NM'ler (0,88 mg/mL) ile etkileşimden sonra HT-29 hücre canlılığı (37°C'de 24 saatlik inkübasyon).....	62

Şekil 4.19. siMcl-1 (A) ve siBcl-xL (B) varlığında ve yokluğunda Fmoc-Lys ve Fmoc-Ca ²⁺ NM'ler (0,88 mg/mL) ile etkileşimden sonra HeLa hücre canlılığı.....	63
Şekil 4.20. Fmoc-Lys NM'lerin SEM (A) ve TEM görüntüleri (B), Fmoc-Lys-Exo yapısının TEM görüntüsü (C).....	68
Şekil 4.21. Fmoc-Lys NM'ler, Fmoc-Lys-Exo yapıları için alınan (ATR-FTIR) spektrumları.....	69
Şekil 4.22. FCS+ ortamında (A) ve FCS içermeyen ortamda (B) farklı konsantrasyonlarda (C1: 0.5 mg/mL; C2: 1 mg/mL) hazırlanan Fmoc-Lys NM'lerin FaDu hücre canlılığı testleri.....	71
Şekil 4.23. FCS içermeyen ortamda farklı konsantrasyonlarda (C1: 25 µg/mL C2: 60 µg/mL) hazırlanan SiNP'lerin FaDu hücre canlılığı testleri.....	71
Şekil 4.24. FCS içermeyen ortamda Fadü (A) ve HNC (B) hücre canlılığı testleri. .	72

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Bazı özelleşmiş dipeptit yapıları ve uygulamaları.....	20
Çizelge 3.1. Fmoc-Lys temeli nanomateryallerinin sentez parametreleri.	38
Çizelge 4.1. Farklı konsantrasyonlarda Ca^{2+} iyonları ile etkileştirilmiş Fmoc-Lys NM'lerin Zeta potansiyel değerleri.	53
Çizelge 4.2. Fmoc-Lys NM'ler ve HSA, IgG ve DNA molekülleri ile etkileşimleri.....	55
Çizelge 4.3. Fmoc-Lys- Ca^{2+} NM'lerin korona yapılarının Zeta potansiyel değerleri.....	56
Çizelge 4.4. 1X siRNA tamponundaki (pH 7.5) parçacıkların DLS parametreleri. ...	59
Çizelge 4.5. siRNA'nın farklı konsantrasyonlardaki Fmoc-Lys ve Fmoc-Lys- Ca^{2+} NM'ler ile etkileştiği elektroforegramın karşılığı.	60
Çizelge 4.6. Fmoc-Lys NM, SiNP, hücreden türetilen eksozomların Zeta potansiyeli ve Zeta boyutu değerleri.	65
Çizelge 4.7. Fmoc-Lys-Eksozom komplekslerinin Zeta potansiyeli ve Zeta boyut değerleri.	65
Çizelge 4.8. SiNP-Eksozom komplekslerinin (SiNP-Exo) Zeta potansiyeli ve Zeta boyut değerleri.	65
Çizelge 4.9. Kolloidal stabilite için Zeta potansiyeli ve Zeta boyutu değerleri.....	67

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATR-FTIR	Zayıflatılmış Toplam Yansıma-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
Bcl-xL	B-cell Lymphoma Gene-xL
Ca²⁺-Fmoc-NM	Ca ²⁺ ile Etkileştirilmiş Fmoc-Lys Nanomateryal
DLS	Dinamik Işık Saçılması
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EV	Ekstrasellüler Veziküller
FaDu	Skuamöz Hücreli Karsinomun Hipofaringeal Tümörü
FCS	Fetal Sığır Serum
Fmoc-Lys	N-(florenilmetoksikarbonil)-L-Lizin
Fmoc-Lys-Exo	Fmoc-Lys NM-Eksozom
GA	Glutaraldehit
HeLa	İnsan Servikal Adenokarsinom Hücre Hattı
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hekzafloro-2-Propanol
HNC	Baş ve Boyun Kanseri Hattı
HSA	İnsan Serum Albümini
HT29	İnsan Kolon Adenokarsinoma Hücre Hattı
IgG	İmmünglobulin G
kDa	Kilo Dalton
LC-MS/MS	Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometrisi
Mcl-1	Myeloid Cell Lymphoma Gene-1
MTT	3-(4,5-dimetil tiyazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazoyum Bromür
mV	Milivolt
NM	Nanomateryal
nm	Nanometre
NM-Exo	Nanomateryal-Eksozom
PBS	Fosfat Tampon Tuz Çözeltisi
PDI	Polidispersite İndeksi
PI	İzoelektrik Nokta
RNA	Ribo Nükleik Asit
RPM	Dakikadaki Devir Sayısı
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopu Analizi
SiNP	Silika Nanopartikül
SiRNA	Küçük İnterferans RNA
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskopu
UV-VIS	Ultraviyole-Görünür Bölge
°C	Santigrat
ζ	Zeta-Potansiyel

1. GİRİŞ

Nanoteknolojideki son gelişmeler, çok işlevli yeni malzemelerin elde edilmesini zorunlu kılmıştır (Aflori, 2021). Biyolojik uygulamalarda kullanılan nano veya mikro mühendislik malzemelerinin çeşitliliği son yıllarda önemli ölçüde arttı (Blanco vd., 2015; Cook ve Perrier., 2020; Mitchell vd., 2017; Williams vd., 2017). Sentetik kimyadaki ilerlemeler nedeniyle malzeme çeşitliliğindeki bu artış, çeşitli boyut ve şekillerde biyomateryallerin ve ilaç dağıtım formülasyonlarının geliştirilmesine yol açmıştır (Cook ve Decuzzi., 2021; Pearce vd., 2021). Tıbbi nanoteknolojide, genellikle 1-100 nm aralığında boyuta sahip nanomateryaller kullanılır. Bu nanomateryaller terapötik ilaç ve cihazların tasarımında, üretiminde kullanılır (Ali vd., 2021).

Nanomateryallerin (NM'ler), bileşenlerinin en az %50'si 1-100 nm arasında bir veya daha fazla boyuta sahiptir. Boyutları (1D, 2D veya 3D), kaynağı (sentetik veya doğal), morfolojileri (yüksek veya düşük en boy oranı) ve bileşimleri (organik, inorganik, kompozit/hibrit ve karbon) göz önüne alındığında, bunlara bağlı birkaç farklı NM kategorisi tanımlanmıştır (Mech vd., 2020; Oksel Karakus vd., 2021).

Nanomateryalleri makromoleküllerden farklı kılan kusursuz özellikleri vardır. Nanomateryallerin boyları nano boyutlara küçüldükçe, benzersiz optik, manyetik ve elektriksel özellikler oluşmaktadır. Yüksek yüzey-hacim oranı, elektriksel iletkenlik, süperparamanyetik davranış ve floresans özellikler gibi nanomateryallerin birkaç ortak özelliği vardır. Tıpta nanomateryaller ilaç taşınmasında, kontrollü ilaç salınımında kullanılmaktadır. Biyolojik engelleri aşmayı sağlayan artan geçirgenlik ve gelişmiş biyouyumluluk da dikkat çeken özellikleridir (Cheng vd., 2021).

Nanomateryaller bu kusursuz özellikleri sayesinde kanser tedavisinde kullanılabilmektedir. Bazı nanomateryallerin yüksek yüzey-hacim oranı sayesinde NM'ler biyomoleküllerle etkileşerek hedefe yönelik tedavide ilaçların etkinliğini artırabilir. (Song vd., 2010).

NM'lerin uygulama alanları boyutlarıyla alakalıdır. Örneğin, küçük NM'ler (<20 nm), kan-beyin bariyerini geçebildikleri ve böbrekler yoluyla hızla temizlenebildikleri için genelde tespit ve görüntülemelerde kullanılırlar. Daha büyük (>20 nm) NM'ler ise, fizyolojik bariyerleri önleyebildikleri ve uzun süre dolaşabildikleri için genelde

taşıyıcı sistemler olarak kullanılırlar. NM'ler genellikle ilaç, gen, aşı dağıtımında taşıyıcı sistemler olarak kullanılırlar çünkü NM'lerin boyutunu, şeklini, morfolojisini, yüzey yükünü ve fizikokimyasal özelliklerini kontrol etmek mümkündür (Banik vd., 2016).

NM'ler tarafından taşınan ajanların farmakokinetik özelliklerinin ve biyolojik dağılımının daha da geliştirilmesi, bunların tümör teşhisi ve tedavisi de dahil olmak üzere biyotıpta kullanılmasına olanak sağlayabilir (Yu vd., 2023).

Kanserli hücrelerin oluşmasına sebep olan moleküler olaylar, sadece mutasyonlar, DNA hasarı, hücre yaşlanması değildir. Kanser ilerlemesinde ekstrasellüler veziküllerin de (EV) rol aldığı bilinmektedir. Ekstrasellüler veziküller, hücre içinde ve hücreler arasındaki iletişimden, atık yönetiminden ve koagülasyondan sorumludur. Hücre zarı aracılığı ile dolaylı bir şekilde veya doğrudan oluşabilirler (Ersöz vd., 2016).

Dünyada önde gelen ölüm nedenlerinden biri kanserdir. Kanseri kontrol etmek, hafifletmek veya iyileştirmek için kemoterapi, gen terapisi, immünoterapi, fotodinamik terapi ve kombinasyon terapisi gibi çeşitli tedavi yöntemleri kullanılmıştır. Bununla birlikte, terapötik ajanların tümör dokularına güvenli ve etkili bir şekilde iletilmesi hala istenmeyen bozunma, immün temizleme, çoklu biyolojik bariyerler ve toksik yan etkiler gibi çeşitli zorluklarla karşı karşıyadır. Neyse ki nanomateriyaller bu sorunlara çözüm bulmak için büyük bir potansiyel sunuyor (Zhang vd., 2024).

Bu tez çalışmasının bir kısmında, HeLa ve HT29 kanser hücrelerinde Mcl-1/ Bcl mekanizmasını spesifik olarak inhibe eden küçük bir müdahaleci RNA (siRNA, siRNA-Mcl-1, siRNA-BCL-2) kullanarak, siRNA dağıtım sistemi olarak da Fmoc-Lys NM'leri kullanarak, Fmoc-Lys-siRNA-Mcl-1 ve Fmoc-Lys-siRNA-Bcl-2 tasarlandı ve bunların anti-kanser mekanizmaları araştırıldı. HT-29 ve HeLa hücrelerinin yalnız siRNA (Mcl-1 ve Bcl-xL) ile etkileşimi sonrası hücrelerde yaklaşık %8–13, Fmoc-Lys-siRNA ile etkileştikten sonra hücre canlılığında yaklaşık %18–40 ve Fmoc-Lys-Ca²⁺-siRNA kompleksler ile etkileştikten sonra hücre canlılığında yaklaşık %20–40 azalma olduğu gösterilmiştir.

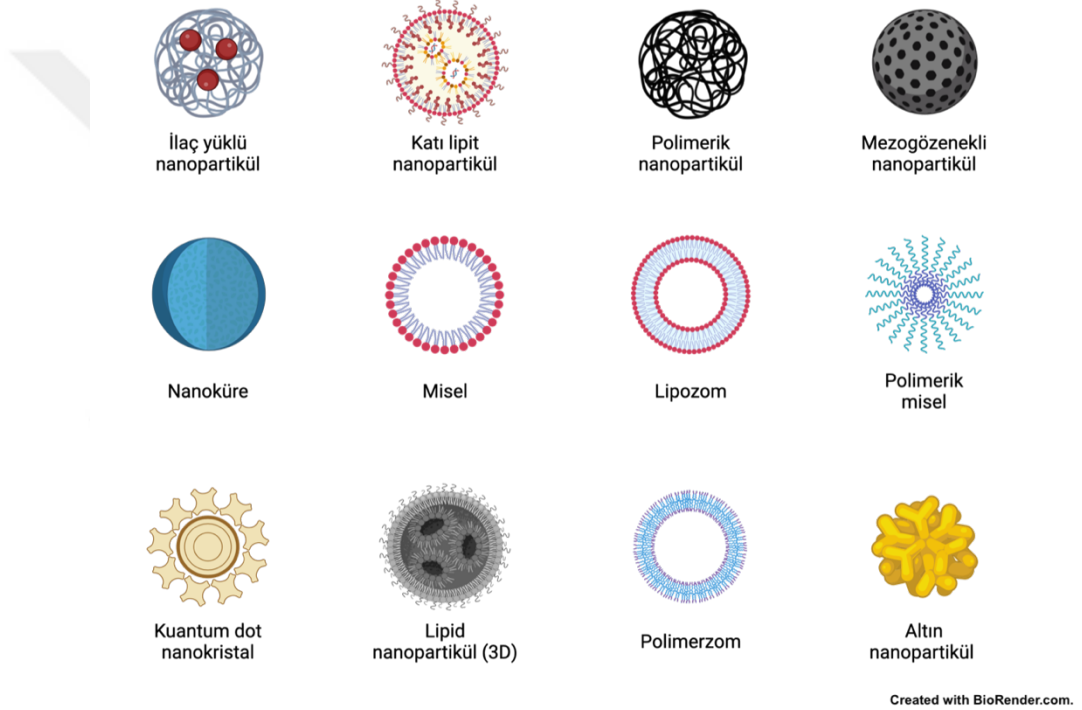
Bu tez çalışmasının diğ er kısmında ise peptit bazlı Fmoc-Lys NM'ler sentezlendi ve karakterize edildi ve eksozomlarla ile etkileşim çalışmaları yapıldı. Bu amaçla, model kanser hücrelerinden elde edilen eksozom hücreleri kullanılarak hücre canlılığı deneyleri yapıldı. Ek olarak, Fmoc-Lys NM'lerin kolloidal kararlılığı da araştırıldı. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, Fmoc-Lys-Exo yapılarının biyokorona oluşturduğu ve toksisiteyi azalttığı gösterilmiştir.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Nanomateriyaller

Son yıllarda nano boyutlu materyaller üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde, nanomateriyaller önemli bir alan olarak gelişmeler göstermiştir. Nano boyutlu materyaller; nanopartiküller, nanotüpler, nanokristaller nanoteller, nanoçubuklar ve nano ince filmler halinde Şekil 2.1'deki gibi farklı sınıflara ayrılmıştır. Nanomateriyallere ilginin yoğunlaşmasının en önemli nedeni, boyutlarından dolayı sahip oldukları önemli özellikleridir (Rao vd., 2004).



Şekil 2.1. Farklı sınıflardaki nanomateriyaller.

Boyutları (<100 nm) normal insan hücrelerinden 1000 kat daha küçük olan nanomateriyaller, hacimli malzemelerden çok farklı üstün özellikler sergilemektedirler. İncelenen çalışmalarda, nanomateriyallerin hücre yüzeyinde veya içinde bulunan ve reseptör görevi gören enzimler, antikolar ve proteinlerle etkileşime girdiği gösterilmiştir (Fan vd., 2014). Ayrıca, nanomateriyallerin sunduğu modifikasyon kolaylığı, onları hastalıklarla mücadelede tanı ve tedavi için mükemmel adaylar haline getirmektedir (Yong vd., 2012).

Nanoterapi, kanserin tanı ve tedavi süreçlerinin kolaylıkla izlenmesi için nanomateriyallerin kullanıldığı bir alandır. Bu sistemlerde görüntüleme ajanı ve ilaç aynı taşıyıcıya yüklenir. Tanı ve tedavi beraber yapılabilirdiği için tedavinin etkinliği de kolaylıkla izlenebilir (Ali vd., 2020).

Nanomateriyaller önemli terapötik etkiler yaratabilir. NM'ler ilaçların istenen hedeflere ulaştırılmasını sağlar, kanser hücrelerinde bulunan ilaca dirençli mekanizmaları atlatabilme kabiliyetine sahiptir. NM'leri kontrol ederek ve istenmeyen reaksiyonları azaltarak, kontrollü ilaç salınımı ve tutarlı ilaç konsantrasyonları mümkündür. Aynı şekilde çalışmalarda, nanomateriyal sistemlerin hassasiyetini iyileştirmeye, sağlıklı hücreleri koruyarak kanser hücrelerini seçici olarak hedeflenmesine yoğunlaşmıştır. Bu çalışmalar, gelecek yıllarda kişiselleştirilmiş ve verimli kanser tedavileri için büyük bir potansiyel sunmaktadır (Benoit ve Koo, 2020).

Nanomateriyaller boyut bakımından 0D, 1D, 2D veya 3D olarak sınıflandırılabilir. Nanomateriyallerin temel bileşimi oldukça karmaşıktır; yüzey katmanını, kabuk katmanını ve temel olarak NM'nin merkezi kısmı olan ve genellikle NM'nin kendisi olarak adlandırılan çekirdeği içerir. Yüksek yüzey:hacim oranı, farklılık, mikron altı boyut ve gelişmiş hedefleme sistemi gibi olağanüstü özellikleri sayesinde bu malzemeler multidisipliner alanlarda büyük önem kazanmıştır (Laurent vd., 2008; Tiwari vd., 2012).

Nanomateriyal temelli kanser tedavisinde hedeflenen dağıtım, serbest ilaçlara göre avantaj sağlar. Nanomateriyallere dayalı hedeflenen dağıtım stratejilerinde son zamanlarda ilerleme kaydedilmiştir. Hedeflenen dağıtım stratejisi, spesifik kanser hücrelerinin hassas bir şekilde hedeflenmesini amaçlamaktadır ve bu, pasif hedefleme veya aktif hedefleme yoluyla gerçekleştirilir. Pasif hedeflemede artırılmış geçirgenlik ve tutma (EPR) etkisi kullanılırken, aktif hedefleme antikorlar, peptitler, aptamerler ve küçük moleküller ile konjuge edilerek elde edilir. Hedeflenen dağıtım serbest ilaçlarla kıyaslandığında, sağlıklı hücrelerdeki sitotoksik etkisini azaltmaya, ilaçları bozulmalardan korumaya, yarı ömrü, yükleme kapasitesini ve çözünürlüğü artırmaya yardımcı olur (Cheng vd., 2021).

NM'lerin, arttırılmış geçirgenlik ve tutma (EPR) etkisini arttırmak için derin dokuya nüfuz ettiği bulunmuştur. Ayrıca yüzey özellikleri, biyoyararlanım ve yarı ömrü gibi

önemli özelliklerini etkiler. Örnek olarak, hidrofilik karaktere sahip bir polimer olan polietilen glikol (PEG) ile etkileştirilmiş NM'ler, opsonizasyonu azaltır ve bağışıklık sistemi temizliğini engeller. Ek olarak, partikül polimer özelliklerini değiştirerek ilaçların veya aktif kısmın salım hızını optimize etmek mümkündür. Sonuç olarak, NM'lerin farklı özellikleri, bunların kanser yönetimi ve tedavisindeki terapötik etkilerini düzenler (Prokop ve Davidson, 2008; Shin vd., 2016).

2.1.1 Nanomateriyal dizaynı, seçimi ve önemi

Mevcut nanotaşıyıcılar demir oksit, kuantum dotlar, altın nanomateriyaller gibi inorganik nanomateriyalleri ve lipozomlar ve dendritik polimerler gibi organik nanomateriyalleri içerir (Dilnawaz vd., 2010; Kretzmann vd., 2019; Nam vd., 2009; Saengkrit, 2014; Wang vd., 2017;). İnorganik nanomateriyaller, eşsiz optik özellikleri veya manyetik ve katalitik özellikleri sayesinde kanserli hücrelerin tedavisinde sıklıkla kullanılsa da, bazıları *in vivo* uzun süreli dolaşım ve sitotoksik sorunlarla karşılaşmaktadır (Maksoudian vd., 2020; Pugazhendhi vd., 2018). Lipozomlar biyouyumludurlar, ama kolaylıkla oksitlenirler, yapısal olarak kararsızdırlar ve ilaçların sızıntısına sebep olabilirler. Terapötik etkilerini iyileştirmek için, uyarana cevap olarak bir ilacı salabilen nanomateriyallerin tasarlanması gerekir; bu da nanomateriyallerin karmaşık sentez aşamalarını daha da karmaşıktırır (Mura vd., 2013).

Protein bazlı NM'ler, biyouyumlu olmaları, biyolojik olarak parçalanabilirlikleri ve düşük immünojeniteleri sayesinde nanotaşıyıcılar arasında öne çıkmaktadır. Ayrıca hazırlama koşulları nispeten daha kolay ve toksik çözücülere ihtiyaç duymazlar (Lohcharoenkal vd., 2014). Proteinler, malzeme ve biyomedikal bilimlerde kendine özgü işlevsellikleri ve avantajları olan doğal biyopolimerlerdir. Proteinler, hem çözücü hem de ilaçla etkileşimi mümkün kılan amfifilliklerinden dolayı NM formülasyonu için uygundur. Protein bazlı NM sistemleri, yüksek düzeyde biyolojik olarak parçalanabilen ve biyolojik olarak uyumlu olan ve özellikle kanser NM'leri gibi farklı biyomedikal uygulamalar için uygun işlevsellikler sergileyen, doğal olarak türetilmiş ilaç iletim sistemleri umut vaat etmektedir (Mohanty ve Park, 2023).

Protein bazlı NM'ler aşağıdaki avantajlara sahiptir:

- i. Doğal biyolojik kaynak: Doğal proteinler kolay metabolize olurlar, biyolojik olarak parçalanabilir ve hedefleme ajanlarının ve ilaçların konjugasyonuna olanak sağlamak için yüzey modifikasyonları mümkündür;
- ii. Çeşitlerinin olması;
- iii. Biyolojik olarak parçalanabilirlik ve biyouyumluluk;
- iv. Kusursuz biyolojik işlevsellik;
- v. Farklı üç boyutlu düzenlenme;
- vi. Hidrofobik ve hidrofilik bileşenler ile etkileşimi sağlayan yüksek amfifil karakter;
- vii. Kimyasal konjugasyonlar için doğal karboksil, hidroksil ve amino grupları.

Protein bazlı NM'ler, yüksek sıcaklık ve zararlı organik çözücülerin olmadığı yumuşak sentez süreçleri ile sentezlenir. Bunlara ek olarak, sentezlenen NM'ler fizyolojik ortamda daha fazla yüzey değişimi olmadan çözünebilir. Diğer NM'lerle karşılaştırıldığında protein bazlı NM'ler, geleneksel terapötik protokollerin sınırlamalarını gidermek için radyasyon, optik, bağışıklık, kataliz, manyetizma, ultrason ve genle ilgili terapötik yöntemlerde yaygın olarak uygulanmıştır (Mohanty ve Park, 2023).

2.2 Peptit Temelli Nanomateriyaller

Çeşitli yapılara ve işlevlere sahip olan peptid bazlı nanomateriyaller, biyomateriyallerin önemli bir türüdür. Mükemmel stabiliteye sahip olan peptid bazlı NM'ler kendiliğinden düzenlenme aracılığı ile sentezlenir. Bireysel peptitlerle karşılaştırıldığında, kendi kendine düzenlenen peptid bazlı NM'ler, mükemmel termo ve mekanik stabilite, yarı iletkenlik, piezoelektrik ve optik özellikler gibi birçok avantaj sunmaktadır. Ayrıca, mükemmel biyouyumlulukları ve biyolojik aktiviteleri nedeniyle, kendi kendine düzenlenen peptid bazlı NM'ler farklı alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Li vd., 2022).

Oldukça farklı şekillere, işlevlere ve mükemmel stabiliteye sahip olan peptid bazlı nanomateriyaller kendi kendine düzenlenerek oluşurlar. Peptid bazlı NM'ler, bireysel peptitlere göre, önemli avantajlara sahiptir (iyi termo ve mekanik stabilite, yarı iletkenlik, piezoelektrik ve optik özellikler). Ayrıca peptit temelli kendiliğinden düzenlenmiş NM'ler, biyolojik aktiviteleri ve biyouyumlulukları sayesinde birçok alanda kullanılmaktadır (Acet vd., 2023).

Kendiliğinden düzenlenmiş peptitlerin önemli avantajlarından biri, moleküler modifikasyonları kullanarak katı faz yöntemleriyle kolayca sentezlenebilmeleridir. Ayrıca antikorlar, enzimler, floresan bileşikler veya manyetik parçacıklar gibi yapılarına dahil edilebilecek bileşiklerle de işlevselleştirilebilirler. Yapılarında α -sarmal ve β -tabaka gibi özel yapılar doğal bir şekilde olabilir ve kendi kendine düzenlenme sürecine katkı sağlayabilir. Hücre dışı matris proteinlerinin etkileşim bölgelerini taklit eden peptitler kullanarak, spesifik etkileşimleri oluşturken immünolojik cevap gibi istenmeyen etkileşimden kaçınılabilir. Kendi kendine düzenlenen peptitler aynı zamanda ilaç taşınımı ve gen transferinde yer alan hücreye nüfuz eden peptit mekanizmaları için de önemlidir (Castillo-León vd., 2011; Kokkoli vd., 2006; Li vd., 2022; Matson, 2011; Pujals vd., 2006; Rubert Pérez vd., 2015). Peptitler ve proteinler, doğada yaygın, kolay erişilebilir ve biyoyumlu olmalarından dolayı biyomedikal malzemeler için oldukça ilgi çekicidir (Okesola ve Mata, 2011; Smith vd., 2011).

2.3 Self Assembly

Kendiliğinden düzenlenme, van der Waals kuvvetleri, elektrostatik kuvvetler, hidrojen bağları ve istifleme etkileşimleri gibi kovalent olmayan etkileşimlerle karmaşık bir yapıdan bir veya daha fazla iyi sıralı yapının seçici ve kendi kendine oluşumudur (Zou vd., 2016; Cosert vd., 2019). Protein ve peptit gibi biyomoleküller ve biyolojik olarak türetilmiş moleküller kendiliğinden bir araya gelerek düzenli yapılar oluşturabilir (Onur vd., 2018).

Proteinler, canlı organizmalar ve dış dünya arasında gerçekleşen sayısız etkileşimlerin işlevsel uygulayıcılarıdır. Proteinler ortamın pH'sına, iyonikliğine sıcaklığına karşı oldukça hassaslardır. Peptitler proteinler gibi biyoyumluluk ve çeşitlilik gösterir, ama daha kolay bulunabilirliğe sahiptirler, daha büyük ölçekte sentezlenebilirler ve proteinlere göre daha yüksek stabilite ve dayanıklılığa sahiptirler. Ayrıca bazı peptitler, fonksiyonel yapı dizilerini stabil tutarak proteinler ile aynı karaktere sahip olabilirler. Birçok çalışma, proteinlerin ve peptitlerin nanoteller, nanofiberler, nanoküreler, nanovesiküller, nanojeller, nanokemerler ve nanotüpler gibi çeşitli nanoyapılarda bir araya getirilebileceğini bildirmiştir (Chen vd., 2016; Cosert vd., 2019; Li vd., 2016; Onur vd., 2018; Pandit vd., 2018; Purwada vd., 2016; Tagalakis vd., 2017; Zou vd., 2016).

Kendi kendine düzenlenme, proteinlere ve peptitlere yalnızca daha yüksek stabilite ve mekanik güç kazandırmakla kalmaz, aynı zamanda agregatların kolektif davranışı nedeniyle doğal aktivitelerini ve işlevlerini daha da geliştirir (Abbas vd., 2017).

Yalnızca 20 doğal amino asit vardır, bundan dolayı doğal amino asitlerin kendiliğinden düzenlenmesi oldukça sınırlıdır. Modifiye edilmiş amino asitler ile kendi kendine düzenlenme yöntemi çok ilgi görmektedir ve bunlardan çoğu 9-florenilmetoksikarbonil (Fmoc) grubu ile modifiye edilmiş malzemeler üzerine odaklanmıştır. Fmoc'un doğal hidrofobisitesi ve aromatikliği sebebiyle, Fmoc ile modifiye edilmiş amino asit, hızlı kendi kendine toplanma kinetiği, iyi fiziksel ve kimyasal özelliklere sahiptir ve hücre kültüründe, fotokatalizde, ilaç dağıtımında ve antibakteriyel uygulamalarda büyük potansiyel sergiler (Ren vd., 2021).

Kendi kendine düzenlenen peptit NM'ler, biyomedikal uygulamalarda oldukça sık kullanılmaktadır. Bu uygulamalar arasındaki en umut verici olanı ilaç dağıtımıdır. Kendiliğinden düzenlenmiş peptit NM'ler biyoyumluluk, düşük maliyet, ayarlanabilir biyoaktivite, yüksek ilaç yükleme kapasiteleri, kimyasal çeşitlilik, spesifik hedefleme ve hastalık bölgelerinde uyarılara karşı duyarlı ilaç dağıtımı gibi avantajlara sahiptir. Birçok araştırmacının araştırdığı nanopartiküller, nanotüpler, nanofiberler ve hidrojeller gibi kendi kendine düzenmiş peptit nanoyapılar, ilaç dağıtımı uygulamalarında kullanılmaktadır (Fan vd., 2017).

Moleküler kendiliğinden düzenlenme, denge halindeki molekülleri kovalent olmayan etkileşimler aracılığıyla kararlı ve iyi düzenlenmiş bir yapı halinde düzenler; bu düzenlenme, biyomedikal uygulamalarda aşağıdan yukarıya üretim yöntemi olarak nanomateriyallerin üretiminde güçlü bir araçtır (Han vd., 2010; Whitesides ve Grzybowski, 2002).

Birçok araştırmacı fonksiyonel malzemeler sentezlerken kendiliğinden düzenlenme sürecinin altında yatan mekanizmaları araştırmıştır. Termodinamik açıdan kararlı bir yapı, temel düzenlenme birimlerini ve reaksiyona giren solvent moleküllerini içeren entalpik ve entropik etkileşimler yoluyla oluşturulur (Stephanopoulos vd., 2013; Wang vd., 2015).

Elektrostatik etkileşimler, hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağları, π - π istiflenme gibi moleküller arası etkileşimler moleküllerin kararlı düşük enerji seviyelerinde olmalarını sağlar (Stupp, 2010). Kendi kendine düzenlenme sürecinde tek molekül tasarımı ve üretimi ile istenen yapılar ayarlanabilir. Birçok özelliğe sahip fonksiyonel malzemelerin geliştirilmesine olanak sağlar (Ma vd., 2013; Sun vd., 2013). Kendi kendine düzenlenen peptitler, kendiliğinden düzenlenme koşullarına bağlı olarak nanofiberler, nanotüpler ve nanoveziküller gibi farklı nanoyapı tasarımlarında düzenlenebilir (Panda ve Chauhan, 2014). Dipeptitler, α -sarmal peptitler, β -tabakalı peptitler, siklik peptitler ve amfifilik peptitler gibi peptitlerin farklı yapıları, kendiliğinden bir araya gelip düzenlenerek farklı alanlarda kullanılmıştır (Fan vd., 2017).

2.4 Peptitlerde Self Assembly Mekanizması

Elektrostatik etkileşim, hidrofobik etkileşim, hidrojen bağı ve π - π istifleme, peptidin kendi kendine düzenlenmesinde önemli katkılar sağlar (Toksoz vd., 2010). Polar olmayan amino asitlerdeki kendiliğinden düzenlenme π - π istifleme ve hidrofobik etkileşimler ile olur. Polar amino asitler, yüksüz veya yüklü yan gruplara sahip olmalarından dolayı düzenlenme ya elektrostatik etkileşimlere ya da hidrojen bağı ile olur (M Leite vd., 2015).

Hidrojen bağları bireysel amino asitlere ve peptit omurgasına önemli bir stabilite sağlar. Elektrostatik etkileşimler, peptidin kendiliğinden düzenlenmesinde amino asitlerin yüklü yan grupları arasındaki itici ve çekici kuvvetleri içerir ve kendiliğinden düzenlenme süreci üzerinde oldukça güçlü etkiler yaratır. Pozitif yüklü peptitlerin, negatif yüklü peptitler hatta ilaçlar ile elektrostatik etkileşimler aracılığıyla bir araya gelebilir. Bundan dolayı ilaç dağıtım uygulamalarında kullanılabilecek stabil bir nanoyapı oluşturabilirler (Fan vd., 2017; Li vd., 2013).

Hidrofobik etkileşimler, peptidin kendiliğinden düzenlenmesi sırasındaki kovalent olmayan etkileşimler arasındaki en önemli etkileşimlerden biridir. Amfifilik peptitlerin kendiliğinden düzenlenmesi, peptit dizilerinde yer alan polar ve polar olmayan kısımların bir arada bulunması sebebi ile termodinamik olarak kontrol edilen mikrofaz ayrımı ile gerçekleştirilebilir. Sulu ortamdaki reaksiyonlarda, temel birimlerde polar olmayan bölümler çökecek ve toplanarak hidrofobik kısmı sudan uzaklaştırmaya

çalışacaktır. Bu arada polar bölgeleri de su ile temaslarını arttırmaya çalışmaktadır (Lee vd., 2010; Wang ve Gong, 2017).

Phe-Phe dipeptit moleküllerinin aseton, piridin ve asetonitril gibi çözücü ortamlarında özellikle hidrofobik etkileşimler ve molekül içi hidrojen bağlarının ön plana çıktığı kendiliğinden düzenlenme sürecinde; hidrofobik etkileşimler, molekül üzerindeki enerjisel bir dağılım aracılığı ile yönlendirme ve düzenlenme üzerine etki eder. Bu etkileşim düzenlenme sürecinin başlangıcında aromatik halka üzerinden yürür. Etkileşimden sonra dipeptitler öncelikle uzamış pileli yapraklar şeklinde düzenlenmiştir. Sonra da oluşan bu yapılar enerjilerini azaltmak için tüp ve küre gibi son şekillerini alırlar (Demirel vd., 2010).

Phe-Phe dipeptitleri kendiliğinden düzenlenme sırasındaki rol alan kuvvetlerden baskın olanı aromatik halkada meydana gelen π - π istiflenmedir. Buna karşın Val-Ala dipeptitleri kendiliğinden düzenlendiği sırada yürütücü olan kuvvet ise moleküller arası ve molekül içi hidrojen bağı etkileşimleridir. Ortamda bulunan çözücü molekülleri ile dipeptit arasında meydana gelen farklı etkileşim türleri sayesinde kendiliğinden düzenlenme mekanizmasını değiştirerek farklı şekillerde dipeptit yapılar elde edilebilmektedir.

Etanol, metanol, piridin ve su gibi çözücüler H-bağı oluşturma yetenekleri güçlü olan çözücülerdir. Bu çözücünün olduğu ortamda meydana gelen kendiliğinden düzenlenmede; çözücü molekülleri, dipeptit molekülleri üzerinde yer alan hidrofilik gruplar ile etkileşimde olduğu düşünülür. Gorbitz'in rapor ettiği bir çalışmada, dipeptitlerin küçük hidrofobik şekillerine rağmen, üç boyutlu yapıda moleküller arası hidrojen bağı etkileşimleri son yapısal şeklin meydana gelmesine öncülük eder (Gorbitz, 2003).

Fmoc-Lys dipeptidinin yapısı aromatik halka içeren moleküler bir yapıdır. Düzenlenmedeki temel mekanizma hidrojen bağı oluşumu üzerinden yürür. Hidrojen bağı oluşumu birim hücrelerin oluşumunu yönetir, 3-boyutlu büyüme de aromatik halkada yer alan π - π istiflenme gruplar tarafından sağlanabilir.

Hekzafloro-2-propanol (HFIP), literatüre göre dipeptitler için kullanılan en önemli çözücüdür. HFIP üzerindeki floro alkol donör gruplarının çözünen moleküller

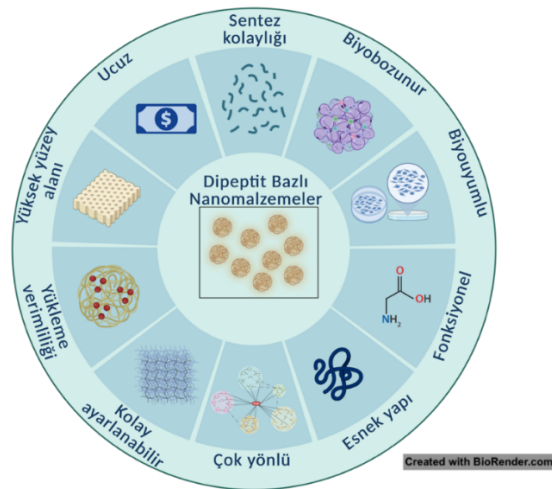
üzerinde bulunan akseptör gruplar ile arasında kuvvetli H-bağı yapabilm yetenekleri sayesinde biyolojik moleküller için iyi bir çözücüdür (Mason vd., 2014). Bu nedenle Fmoc-Lys dipeptidi için oldukça iyi bir çözücü olan HFIP çözücü ortamında kendiliğinden düzenlenme çalışmaları yapılmıştır.

2.5 Dipeptitler

Peptitler (özellikle kısa peptitler), mükemmel biyoyumlulukları, sentez kolaylıkları, işlevsellikleri ve kontrol edilebilir biyoaktiviteleri sayesinde yapılarını çevre koşullarına göre ayarlayabilmeleri nedeniyle büyük ilgi görmektedir. Dipeptit kadar küçük olan kısa peptitler, kendi kendine düzenlenerek keşfedilmiştir. Dipeptit kendiliğinden birleşmesi ile ilgili ilk çalışma, amiloid $\beta(A\beta)$ polipeptit segmentinin çekirdek motifi olan dipeptid difenilalanin (FF)'i araştıran Gazit ve arkadaşları tarafından sunulmuştur. FF'nin yüksek düzenli yapılar olan nanotüplere, nanotellere, ve nanoormanlara kendiliğinden düzenlenerek bir araya geldiği bulunmuştur.

Gazit ve ark. tarafından enerji depolanması ve mikroakışkan çipler için yüksek yüzey alanlı elektrotlar gibi davranabilen nanotüp dizilerinin oluşturulması için FF temelli dipeptitler kullanıldı. Kendiliğinden düzenlenen FF nanoyapılar, nanoaygıtların, nano-biyosensörlerin ve düşük dirençli iletken nanotellerin yapımı gibi farklı uygulamalarda kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır (Adler-Abramovich vd., 2009; Panda ve Chauhan, 2014; Reches ve Gazit, 2003; Reches ve Gazit 2006; Wang vd., 2011; Zhu vd., 2010;).

Dipeptit temelli NM'lerin bazı üstün özellikleri Şekil 2.2'deki gibidir.



Şekil 2.2. Dipeptit nanomateryallerin üstün özellikleri.

Dipeptitler, peptitlerin alt üyeleri olduğu için aynı özellikleri sergilerler. Dipeptitlerin kullanım kolaylığı, işlevsellik kolaylığı vb. özellikleri onları diğer peptit yapılarından ayırmaktadır. Peptit nanomateriyaller, kendiliğinden düzenlenme ile sentezlenerek çeşitli işlevlere ve mükemmel stabiliteye sahiplerdir. İyi düzenlenmiş üst yapılara sahip peptit nanomateriyaller, bireysel peptitler ile karşılaştırıldığı zaman, iyi termo ve mekanik stabilite, yarı iletkenlik, piezoelektrik ve optik özellikler gibi üstün özellikler gösterirler. Ayrıca peptit bazlı kendi kendine düzenlenen nanomateriyaller, biyolojik aktiviteleri ve mükemmel biyouyumlulukları sayesinde birçok alanlarda oldukça önemlidir (Li vd., 2022).

Kararlı supramoleküller, moleküllerin termodinamik koşullar altında kovalent olmayan etkileşimler aracılığıyla kendiliğinden bir araya gelmesi ile oluşurlar. Buna benzer yapılar doğada her yerde bulunur. Peptitin kendi kendine düzenlenmesini etkileyen faktörler içsel faktörler ve dışsal faktörler olarak ayrılır. İçsel faktörler peptidin dizisi, amino asitlerin sayısı ve yan zincirleri gibi peptidin yapısıyla alakalı faktörler olabilirken, dış faktörler ortamla alakalı olan pH, sıcaklık, solvent ve ultrason gibi faktörler olabilir (Li vd., 2022; Whitesides vd., 1991).

Sıcaklık değişimleri, ikincil yapıda geri dönüşü olmayan değişimlere yol açtığı gösterilmiştir. Öte yandan oda sıcaklığında birkaç hafta bekledikten sonra yeniden düzenlenmenin oluşabildiği gözlemlenmiştir. Huang ve ark. sıcaklık parametresinin, sıcaklığın neden olduğu peptidin kendi kendine düzenlenmesi sırasında peptit yapısını doğrudan etkilediğini göstermiştir. pH değişiklikleri amino asitlerin protonasyon hızını etkileyerek morfolojik çeşitliliğe sebep olabilir. Asidik koşullarda (pH 3,5 civarında), güçlü elektrostatik itmeler sebebiyle peptidlerden uzun nano liflerin oluşması önlenmiştir. Alkali koşullar altında (pH 12,5 civarında), peptit moleküllerinde nötr elektrik sebebi ile β -yapraklarının oluşumu güçleşir. Güçlü elektrostatik çekimden dolayı, hidrofilik amino asitler düzenlenerek bir araya gelir, böylece çözünürlük azalarak çökelme oluşur. Kendiliğinden düzenlenen peptit yapısı üzerine yapılan başka bir çalışmada ise, yüksek ve düşük pH'lı ortamlarda nanokemerlerin katmanlarında farklılıklar gözlenmiştir, düşük pH'da çok katmanlı, yüksek pH'da ise çok katmanlı yapılar kırılmış, tek ve çift katmanlı nanokemerler araştırılmıştır. Çözücülerin kendi kendine düzenlenme morfolojisi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Su ve tetrahidrofuran (THF) bulunan ortamlarda 4

dipeptit ile yapılan çalışmalar, farklı solventlerin peptitlerde kiral istiflenme ve agregasyonu etkilediği gösterilmiştir (Cui vd., 2009; Cui vd 2010; Ghosh vd., 2012; Huang vd., 2014; Li vd., 2013; Luo vd., 2008; Zhou vd., 2005).

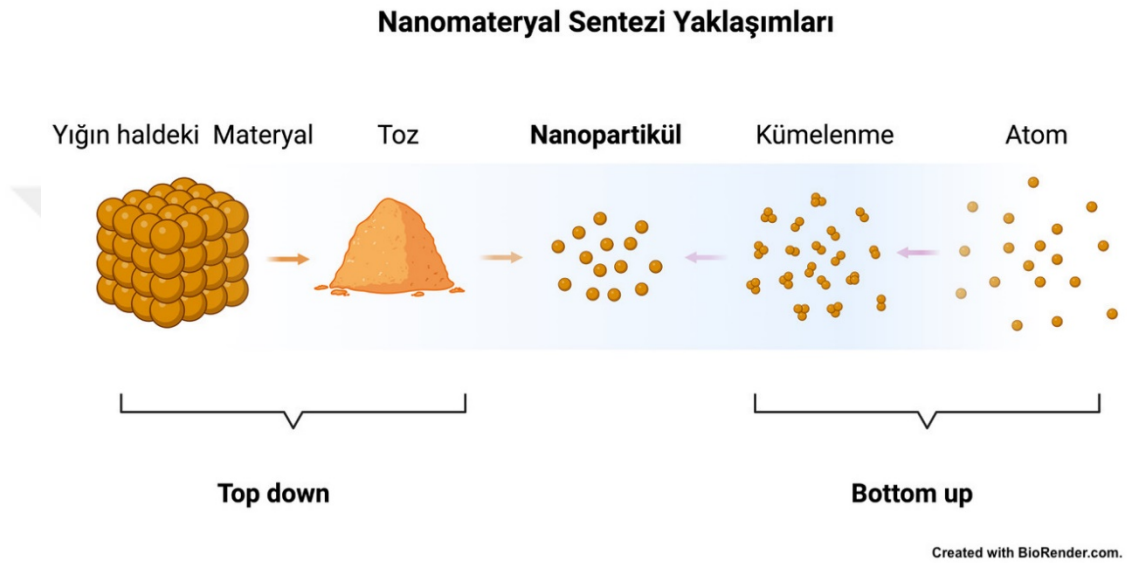
Son zamanlarda araştırmacılar, kısa peptitlerin, sentezindeki zorluğunu ve maliyetini en aza indirebilecek ve aynı zamanda stabiliteyi artırabilecek kendi kendine düzenlenme yeteneğine sahip birçok farklı nanoyapı olduğunu bildirmişlerdir (Chen vd., 2010; Veiga vd., 2012). Bunlar arasında, kendi kendine düzenlenen dipeptit nanomateriyaller, ilaç dağıtımının da dahil olduğu birçok alanda araştırılmaktadır. Kendi kendine düzenlenen farklı nanoyapılar için kullanılan ilk dipeptit difenilalanindir Phe-Phe (FF). FF dipeptitinin kendiliğinden düzenlenerek nanopartiküller, nanotüpler, nanoveziküller ve nanoteller gibi farklı şekillerdeki nanoyapılarının çalışmaları bildirilmiştir (Fan vd., 2017; Görbitz, 2006).

Peptitlerin kendiliğinden düzenlenme süreci, iç veya dış uyaranlarca etkilenebilir, bundan dolayı uyaranlara duyarlı peptit nanomateriyallerin mühendisliği ve uygulamaları mümkündür. Biyomedikal ve doku mühendisliği uygulamaları için peptit nanomateriyallerin kullanımı oldukça önemlidir (Xiang, 2023; Wang vd., 2019).

Uyaranlara duyarlı peptit nanomateriyallerin kendiliğinden düzenlenme sürecinde genellikle, itici güç olarak peptitteki özel bölgeleri uyarmak için bir ajan gereklidir. Sıcaklık, pH, metal iyonları, çözücü ortamı, peptitlerin kendiliğinden düzenlenmesini etkileyebilir. Ayrıca peptitlerin modifikasyonu belirli maddelere yanıt da sağlayabilir (Chang vd., 2021; Li vd., 2023; Sun vd., 2020; Zou, 2017). Uyaranlara duyarlı özelliklerin varlığı, biyosensörler, ilaç dağıtımı, tümör teşhisi ve biyogörüntüleme gibi biyomedikal alanlarda oldukça önemlidir. Peptitlerin tasarlanabilirliği, değiştirilebilirliği ve çevre dostu sentez yöntemlerine dayanarak, farklı ortamlarda kullanılacak uyaranlara duyarlı peptit nanomateriyallerin tasarımı, biyotibbin geliştirilmesi için daha fazla seçenek sunmaktadır. Bununla birlikte, amino asit yan zincir gruplarının zenginliğinden tam olarak yararlanmak ve peptitlerin, peptitleri işlevselleştirmek için değiştirilebilmesi özellikle önemlidir (Mu, 2024; Munro ve Knecht, 2018; Patel vd., 2021; Su vd., 2020).

2.6 Bottom up ve Top Down Stratejileri

Dipeptit temelli NM'ler farklı şekil, boyut ve yapıya sahiptir. Bunu başarmak için çok sayıda sentez yöntemi benimsenmiştir. Bu yöntemler iki ana gruba ayrılır: Bunlardan ilki bottom-up (aşağıdan yukarıya) yaklaşım ve ikinci olarak da top-down (yukarıdan aşağıya) yaklaşım. Bu yaklaşımlar reaksiyon koşullarına ve çalışmaya bağlı olarak farklı alt sınıflara ayrılabilir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Nanomateriyallerin sentez yaklaşımları.

Bottom-up yaklaşım: Bu yöntem, atomlardan kümelere ve NM'lere kadar yapı malzemeleri içerir, yani daha basit maddelerden yapı oluşturma, dolayısıyla yapıcı yöntem olarak bilinir (Yang vd., 2014).

Top-down yaklaşım: Bu yöntemin, NM'leri sentezlemek için toplu malzemeleri azaltan yıkıcı yöntem olduğu bilinir. Daha büyük olan molekül parçalanarak küçük birimlere ayrışır ve NM'leri oluşturur (Shafey, 2020). NM'lerin boyut, şekil ve yük parametreleri, reaksiyon koşullarına ve diğer sentez parametrelerine bağlıdır. Ayrıca sentez mekanizması NM'lerin kimyasal özelliklerini de belirler. Bu nedenle büyüme mekanizmasını anlamak, NM'leri sentezlemek için gereklidir (Lassalle ve Ferreira, 2007).

Biyolojik temelli nanomateriyallerin sentezinde aşağıdan yukarıya ve yukarıdan aşağıya olmak üzere iki tamamlayıcı yaklaşım vardır. Yukarıdan aşağıya yaklaşımda

nanomateriyaller, karmaşık biyolojik yapılı moleküllerin kontrollü bir şekilde uzaklaştırılması, yani katmanların ayrılması ile elde edilebilmektedir. Aşağıdan yukarıya yaklaşımda ise moleküllerin bir araya gelmesiyle yeni moleküller üstü yapılar sentezlenebilmektedir.

Nanomateriyal sentezinde yer alan her molekülün yapısının ve birbirleriyle etkileşiminin bilinmesi gerekir ve nanomateriyallerin sentezinde kullanılan teknik önemlidir. Moleküler düzeyde düzenli yapıların oluşması, elektrostatik etkileşim, hidrojen bağı, hidrofobik etkileşim ve aromatik istifleme gibi kovalent olmayan zayıf etkileşimler aracılığıyla oluşur. Sulu ortamdaki lipid molekülleri birleşip yağ damlacıklarını oluşturması veya 4 hemoglobin polipeptitinden tetramerik hemoglobin proteininin oluşması gibi doğada sıklıkla karşılaşılan bu durumlar, moleküler kendi kendine düzenlenme sonucu meydana gelir (Gazit, 2007; Zhang, 2003).

2.7 Protein-Korona ve Nanomateriyal Etkileşimleri

Nanoteknolojinin disiplinler arası bir alanı olan “nanotıp”, kapsamlı bir araştırma alanı olarak son derece ilgi uyandıran, tıbbi teşhis ve terapötik müdahalelerde ilerlemeler için muazzam bir potansiyel sunan ve gelişmekte olan bir disiplindir. Yıllardır, ilaçların keşfi için yapılan araştırmalar, birçok hastalığa etkili tedavi olmuştur.

Ancak bu ilaçların büyük çoğunluğu, yetersiz etkinlikleri ve potansiyel toksisiteleri nedeniyle standart tedavi olarak uygulanamamıştır. Bu başarısızlığın temel nedenlerinden biri biyoyoumluluk eksikliğine bağlanabilir (Sacks vd., 2014; Schuster vd., 2005; Van Norman, 2016; Yang vd., 2021).

“Nano-biyo arayüz” yani nanomateriyallerin biyolojik sistemlerle etkileşimi, nanotıp alanında oldukça önemlidir. Bu yönetimin yapılabilmesi için nanotıpların biyolojik ortamları ile etkileşimlerinin anlaşılması son derece önemlidir. Biyofarmasötik ajanların kalitesinin artırılması, "Tasarımdan Gelen Kalite" kapsamında öncelikli olarak ilk hedeftir. Bu sadece hedeflenmiş klinik kullanımı değil aynı zamanda farmakokinetiğini, farmakodinamiğini ve toksik etki potansiyelini de kapsamaktadır. Bu nedenle hem etkili hem de toksik olmayan ilaçların tasarımına öncelik verilmesi önemlidir (Acet, 2023; Brumano vd., 2019; Colombo vd., 2018; Eon-Duval vd., 2012).

Biyolojik kullanımlara göre NM'ler farklı boyutlarda ve şekillerde olabilirler ayrıca fizikokimyasal özellikleri de büyük farklılık gösterebilir. Çoğunlukla inorganik çekirdekler yüzey ligandlarıyla kaplanır, bu da NM'lere koloidal stabilite ve proteinlerin ve diğer biyomoleküllerin spesifik olarak hedeflenmesi için fonksiyonel gruplar kazandırır. NM'ler tipik olarak biyomaddeye karşı reaktif olan yüzeylere sahiptir ve biyolojik makromoleküller (biyoakışkanlar) içeren biyolojik sıvılara maruz kaldıklarında, örn. *in vitro* çalışmalarda hücre kültürü ortamları veya intravenöz enjeksiyon üzerine kan kullanıldığında, bunların yüzeyleri hızla çözünmüş bileşenler, özellikle proteinler tarafından kaplanır. Böylece 'protein korona' oluşur (Cedervall vd., 2007). Protein korona NM'lere 'biyolojik bir kimlik' kazandırmaktadır yani bir organizmadaki hücreler, esas olarak plazma zarındaki reseptör proteinleri vasıtasıyla, NM yüzeyinden hariç bu ad katmanıyla etkileşime girmektedir (Monopoli vd., 2020). Protein koronanın fiziksel doğası büyük ölçüde NM'lerin (yüzey) özellikleri ve biyoakışkanda mevcut olan biyomoleküllerin türleri ve bunların bireysel özellikleri ve (göreceli) miktarları tarafından yönetilir (Caracciolo vd., 2014; Monopoli vd., 2011; Mirshafiee vd., 2016; Nel vd., 2009).

NM'lerin herhangi bir biyomedikal uygulamasında ilaç taşıyıcıları olarak korona oluşumunu moleküler düzeyde anlamak son derece önemlidir, böylece biyolojik çevre üzerindeki etkilerini kontrol etmek ve tahmin etmek mümkün hale gelir (Lane vd., 2015). NM'ler biyolojik bir sıvıya bırakıldıklarında, proteinlerle ve diğer biyomoleküllerle rastgele çarpışarak etkileşir. NM yüzeyleri ile protein ilişkisi, entalpik ve entropik olarak stabilize edilir. Entalpik olarak kovalent, elektrostatik, van-der-Waals, hidrojen bağı etkileşimlerin oluşumuyla stabilize edilir. Entropik olarak ise birleşen yüzeylerden küçük moleküllerin serbest bırakılması, proteinlerin konfigürasyonel entropi değişiklikleri gibi etkiler stabilize edici katkılardır (Rodriguez-Quijada vd., 2018; Wang vd., 2019).

Nanomateriyallerde parçacık boyutunun ve şeklinin önemi, biyolojik etkinliğin belirlenmesinde çeşitli etkileşimlerin kilit rol oynamasından kaynaklanır. Boyut, şekil, yüzey yükü ve kimyasal işlevsellik gibi malzeme özellikleri, biyolojik sistemlerle arayüzdeki çok çeşitli etkileşimleri değiştirebilir. Tasarım parametreleri dolaşımı, hücre yüzeyini ve hücreye girme yollarını, mukozal taşınmayı ve biyodağılımı etkileyebilir. Araştırmacılar dolaşım süresi ve biyolojik dağılımın nanomalzeme

morfolojisinden büyük ölçüde etkilendiğini göstermişlerdir (Decuzzi vd., 2010; Hoshyar vd., 2016)

Biyomedikal alanda kullanılan nanoyapıların fizikokimyasal özelliklerinin yanı sıra, içinde bulundukları biyolojik ortam da potansiyel biyolojik etkilerinin belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Fizyolojik bir sıvının içindeki NM'lerin, farklı bileşenlerle (tuzlar, şekerler ve proteinler) farklı kolloidal etkileşimlere girmesi muhtemeldir. Bu “nano-biyo arayüz”, NM'lerin yüzeyleri ile biyolojik bileşenler arasında gerçekleşen olay fizikokimyasal etkileşimleri, kinetik ve termodinamik faktörleri içerir. Nanomateryallerin *in vivo* stabilitesi bu etkileşimlerden önemli ölçüde etkilenebilir ve bu da önemli sonuçlara yol açabilir. Parçacık ve konjugasyon tasarımının tamamını korumak için temel fiziksel ve kimyasal araştırmalar sıklıkla kontrollü ortamlarda gerçekleştirilir. Ayrıca bu parçacıkların biyoyumlulukları ve biyolojik dağılımları, fizyolojik sıvılara bırakıldıklarında parçacık içinde gerçekleşen değişimlere dayanır.

Kan, interstisyel sıvı ve hücre içi ortamı içeren fizyolojik ortama girdikten sonra, NM'lerin biyomoleküllerle etkileşiminde esas olarak van der Waals kuvvetler, hidrojen bağları, elektrostatik etkileşim, hidrofilik/hidrofobik etkileşimler dahil olmak üzere farklı kuvvetler mevcuttur. Bu kuvvetler, NM'lerin yüksek yüzey enerjisine ve ayırt edici yüzey kimyasına atfedilir. Sonuç olarak biyomoleküler korona yapısının oluşmasına neden olur (Fong vd., 2019; Monopoli vd., 2020).

NM'lerin biyolojik sıvılarla temasa girer girmez biyomolekül katmanları oluşturduğu edilmektedir. NM'ler üzerinde adsorbe edilen ve biyolojik bir modül olarak işlev gören, “protein korona” olarak bilinen karmaşık protein katmanı nedeniyle bireysel protein düzeyini anlamak zor olabilir.

Koronanın oluşumu, kinetik ve dinamiklerin olduğu karmaşık bir süreçtir. Bundan dolayı, NM'lerin *in vivo* kabiliyetleri, bu NM'lerin biyolojik etkilerini ve toksisitelerini belirleyen bir protein koronanın meydana gelmesinden önemli ölçüde etkilenir. Protein koronanın bileşimi, metalleri, polimerleri, kompozitleri, metal oksitleri ve karbon nanotüpleri kapsayan NM sistemleri için kullanılan kaynaklara veya üretim yöntemlerine bağlı olarak dikkate değer farklılıklar sergiler (Park, 2020).

Protein korona profilleri ile NM'lerin *in vivo* performansı arasındaki korelasyona yönelik farkındalık arttıkça, protein koronanın varlığından kaçınmak yerine potansiyelinden yararlanmak için son zamanlarda çabalar sarf edilmektedir. Bir dizi çalışmada protein koronanın, ilaç dağıtımını kolaylaştırdığı kanıtlanmıştır. Bu nedenle, protein korona artık NM aracılı ilaç dağıtımının etkinliğini arttırmada potansiyel bir müttefik olarak yeniden odaklanılmasına yol açıp ve bir düşmandan bir arkadaşla dönüşmüştür (Kim vd., 2023; Li vd., 2021; Wang vd., 2023).

Nano ölçekli yapılar biyolojik sıvılarla temasa geçtiğinde, orijinal kimliklerinin kaybı ve yeni bir biyolojik kimlik kazanılmasıyla sonuçlanan bir dönüşüme uğrarlar. Protein korona, NM'lerin yüzey yükü, boyutu ve toplanma durumu gibi çok sayıda fizikokimyasal özelliğini değiştirir. Sonuç olarak, plazma ve serum proteinlerini içeren bir sıvının içindeki hafif değişikliklerin, NM'lerin yüzeyinde meydana gelen protein koronanın yapısını önemli derecede değiştirebileceği bilinir (Vence vd., 2020).

2.8 Dipeptitlerin Kullanım Alanları

Hem biyolojik hem de çevresel uygulamalar için üretilen NM'ler sıklıkla farklı fonksiyonel gruplarla işlevselleştirilerek/dekore edilerek daha kullanışlı hale getirilmektedir. Bu amaçla NM yüzeyinde farklı organik veya inorganik yapılarla işlevselleştirme yapılabilir. Peptit bazlı NM'lerin yüzey yükü bazen sınırlı olabilir. Örneğin, NM'lerin yüzey yük yoğunluğu, gen parçası gibi biyolojik bir materyal ya da hücreye hedeflenecek aktif bir ilaç için yeterli olmayabilir (Acet vd., 2023).

Böyle durumlarda yüzey modifikasyonlarına ihtiyaç duyulabilir. Bozdoğan ve ark. tarafından, negatif yüklü siRNA parçacıkları ile hücre uygulamasını yapmak için yeterli yüzey yükü yoğunluğuna sahip olamayan difenilalaninamid (FFA) temelli NM'leri kullanıp, NM'lerin yüzeylerini polikasyonik lizin ile kaplayarak NM'lerin yüzeyinde katyonik bir yük meydana getirmiştir (Bozdoğan vd., 2017). Dipeptitlerin gerek biyoyumluluğu gerek toksik olmama gibi üstün özelliklerinden dolayı biyotıp alanında kullanımına son derece elverişlidir. Dipeptitlerden bazı maddelerin tespit ve saflaştırılmasına yönelik amaçlarla da yararlanılabilmektedir (Dikici vd., 2023).

İlaç dağıtım ve taşıyıcı sistemler olarak peptit bazlı NM'lerin kullanımları Çizelge 2.1'deki gibidir. Özellikle ilaç taşıyıcı olarak görev yapan peptit tabanlı NM'lerin son

derece kullanışlı ve umut vadeden yapılar olarak göze çarpmaktadır. Doğal ve sentetik kaynaklı peptidleri geniş bir biyolojik etkileşim aralığında çalışabilen bileşiklerdir.

Çizelge 2.1. Bazı özelleşmiş dipeptit yapıları ve uygulamaları.

Dipeptid	Uygulama	Referans
P11-4 ve P11-8 polipeptitlerinden oluşan dipeptit hidrojel	Tendon onarımı	(Zhang vd., 2024)
Kendi kendine birleşen Eu-dipeptid (triptofan-fenilalanin) mikropartikülleri	Algılama	(Yan vd., 2024)
Fmoc-FF/TiO ₂ hidrojel	Fotodegradasyon	(Li vd., 2024)
Dipeptit nanofiberler	Doku kaplamaları	(Das vd., 2015)
Fe ₃ O ₄ nanopartikülleri ile konjuge edilmiş ve muramil dipeptit ile yüklenmiş manyetik içi boş mezogözenekli altın nanokafesleri	Teşhis ve ilaç dağıtımı	(Wang vd., 2020)
Dipeptit kaplı demir oksit nanopartikülleri	Bilgisayarlı tomografi görüntüleme	(Li vd., 2015)
Dipeptit bazlı nanomiseller, dipeptit bazlı hidrojel	Antioksidan ajanlar	(Saada vd., 2011)
N-florenilmetoksikarbonil-difenilalanin	İlaç taşıyıcı	(Li vd., 2021)

Biyoteknolojik uygulamalarda hem terapötik hem de teşhis aracı olarak önemli rol oynarlar. Son zamanlarda peptit tabanlı NM'ler ilaç dağıtımında ve nanotıp akıllı uygulamalarında büyük başarı elde etmiştir. Bu sistemler, ilaçları seçici olarak yalnızca patolojik dokulara verirken vücudun diğer bölgelerini de koruyabilirler. Bu spesifik özellik ilacın yan etkilerinin azalmasına ve ilacın etkinliğinin artmasına da olanak sağlar. Bu bağlamda peptid bazlı agregatlar, biyouyumluluk, yüksek ilaç yükleme kapasiteleri, kimyasal çeşitlilik, spesifik hedefleme ve uyarılara duyarlı ilaç dağıtımı dahil olmak üzere birçok avantaj sunar (Tesauro vd., 2019).

2013 yılında Alves ve ark. potansiyel ilaç dağıtım araçları olarak ilk kez FF bazlı mikrotüpleri (FF-MT'ler) literatüre önermiştir. Bu çalışmada yaygın bir boya olarak kullanılan Rhodamine B (RhB) model ilaç olarak kullanılmıştır. Sonuçlar, FF-MT'lerin toksisitelerinin *in vitro* olarak daha düşük olduğunu ve FF-MT'lerin ilaçları sabit oranlarda dağıtma potansiyelinin olduğunu göstermiştir (Silva vd., 2013).

FF peptid bazlı nanofiberlerin, yakın zamanda kanser tedavisi için hidroksikamfotesin (HCPT) gibi hidrofobik ilaçların taşıyıcı araçları olarak da literatüre sunulmuştur. Bu çalışmada, bazı L-amino asitlerin D-karşıtları ile değiştirilmesi, bu peptitlerin endojen

peptidazlar tarafından katalize edilen hidrolize karşı *in vitro* ve *in vivo* biyostabilitesinin daha da geliştirilmesine izin vermiştir. Proteaz stabilitesi, bir sıçan modelinde tümör kütesinin azaltılmasıyla uzun süreli terapötik etkiye izin verdiği ortaya konulmuştur (Liu vd., 2014).

2006 yılında Ulijn ve arkadaşları Fmoc-FF'yi fizyolojik koşullar altında lifli nano yapıya sahip homojen, şeffaf, bir hidrojel oluşturabilen ilk dipeptitlerden biri olarak tanımladılar (Jayawarna vd., 2006).

2.9 Dipeptit NM'lerin Kanserdeki Rolü ve siRNA Mekanizması

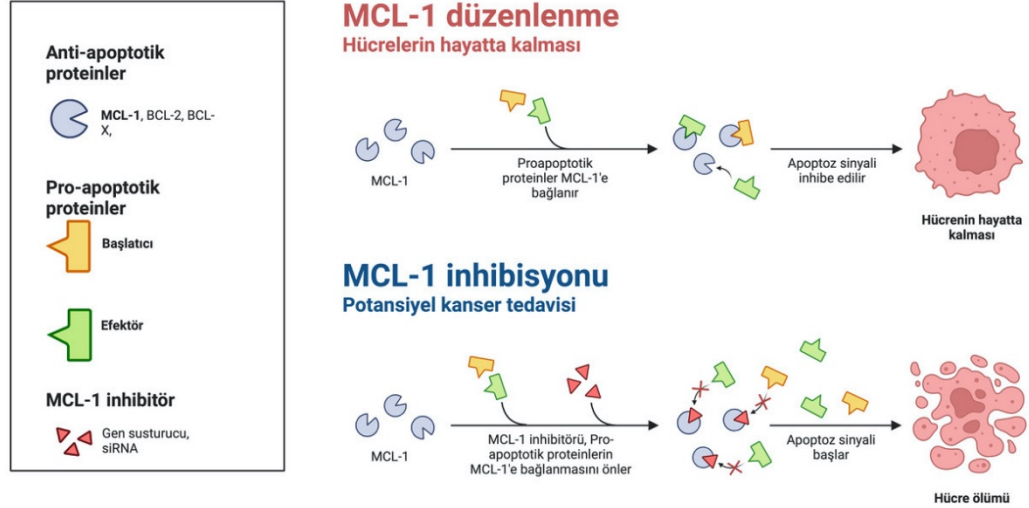
Kemoterapi, kanser hücrelerini ortadan kaldırmak için toksik ilaçlar kullanılmasından dolayı başarılı bir tedavi türü olarak kabul edilmektedir. Fakat, kemoterapi ilaçları kanser hücrelerini öldürürken vücudun bağışıklık sistemini baskılayabildiği de bilinir. Kanser, dünyada en sık görülen, insan sağlığına zarar veren hatta ölümcül olan hastalıklardan biridir.

Geleneksel ilaçlarda ve tedavi rejimlerinde terapötik etkiler genelde daha düşüktür ve yan etkileri mevcuttur. Bu sebeple, mevcut ilaçların ve tedavilerin kısıtlamalarını göz önünde bulundurmak, yenilikçi tedavi rejimlerini aramak en önemli önceliktir (Wu vd., 2022).

Kanserli hücrelerin etrafında oluşan bağışıklık tepkisi, bağışıklık hücreleri ile tümörlü hücreler arasında meydana gelen bir dizi karışık reaksiyonun olduğunu göstermiştir. Bu karmaşık olaylar, tümörlü hücrelerin büyümesini ve ilerlemesini kontrol eden bir tümör immün mikro ortamı (TME) yaratmıştır (Zhu vd., 2021).

Kanserin en önemli ayırt edici özelliğinden biri apoptozun önlenmesidir. (Hanahan, 2022). Kanserli hücreler genelde Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1 gibi anti-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinlerinin sayısını arttırır ve bu da ürotelyal kanserler de dahil olmak üzere birçok kanserde tedavi direncine yol açar (Kiss vd., 2015; Korkolopoulou vd., 2002; Yoshimine vd., 2013). BH3 mimetikleri, kanserli hücrelerde apoptozu tetikleyebilen anti-apoptotik proteinleri hedef alan yeni geliştirilmiş ilaçlardır. Ancak Mcl-1'i hedef alan BH3 mimetikleri halen geliştirilme aşamasındadır (Caenepeel vd., 2018; Diepstraten vd., 2022; Edlich, 2018; Kotschy vd., 2016; Tron vd., 2018). Bcl-2 ailesinde bulunda anti-apoptotik proteinlerin, anti-kanser ilaçlarından kaynaklanan

hücre ölümünü baskıladıkları gösterilmiştir. Bu yüzden, Bcl-2 ailesi üyelerini inhibe eden tedavi edici yöntemler, kanseri yok etmek adına önemli bir yol olabilir (Adams ve Cory, 2007; KW, 2008). Şekil 2.4'te bu mekanizmalar verilmiştir.



Created with BioRender.com.

Şekil 2.4. Anti-apoptotik proteinlerin düzenlenme mekanizması.

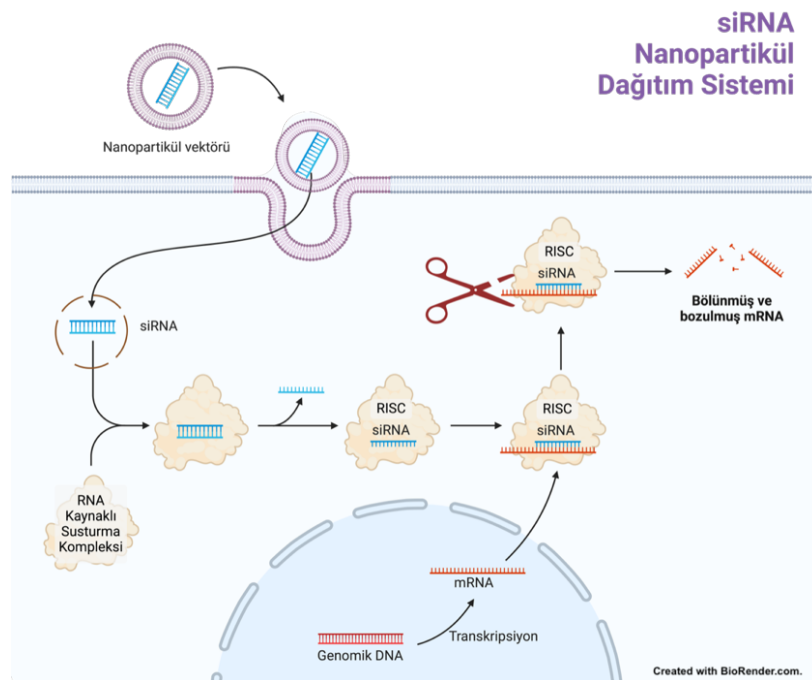
Bunun dışında yürütülen çalışmaların sonucunda, anti ve pro apoptotik üyelerin, korunan bir Bcl-2 homoloji (BH3) alanı düzenlenmiştir ve bu yüzden kanser tedavisinde birçok BH3 mimetikleri dizaynı ile sonuçlandığı gösterilmiştir (Llambi ve Green, 2011; Weyhenmeyer vd., 2012).

Tümör hücrelerinde apoptozun tetiklenmesi, kanser tedavisinde olası bir hedeftir. Bcl-2 ailesi proteinleri, apoptotik yolun düzenlenmesi sırasında kilit rol alır. Bcl-2 fazla ekspresyonunun özellikle göğüs kanseri, prostat kanseri ve lenfomalar da dahil birçok kanser türüyle ilişkili olmuştur. Bu yüzden, Bcl-2 ailesi proteinleri ilgi uyandıran yeni bir anti-kanser hedef olmuştur. Antikanser ilaçlarına karşı meydana gelen direnç, B hücreli lenfoma-2 (Bcl-2) ailesi proteinlerinin değişen ifadesidir. Bu yüzden, Bcl-2 ailesinin proteinleri, tümörün başlangıcı, büyümesini kontrol eden, radyoterapi ve kemoterapiye olan direncin kırılmasını sağlayan apoptoz sürecinin kontrolcülerini olarak ortaya çıkmıştır (Gonsalves vd., 2018; Martinou ve Youle, 2011; Oltersdorf vd., 2005).

Tümör tedavisi geliştirme araçlarından biri, içsel olarak ayarlanmış hücre ölümünü aktifleştirmektir. Anti-apoptotik proteinlerin ve mitokondriyal zarlar üzerinde bulunan

taşıyıcı proteinlerin etkileşimlerini engellenmek, bu girişimin temelidir. Bu sebeple, Bcl-2 ailesinin hayatta kalmaktan yana olan proteinleri, bu terapötik müdahaleye potansiyel hedefler olmuştur. Küçük müdahaleci RNA'lar (siRNA'lar), gen transkripsiyonunu diziye özgü bir şekilde susturabilen, 21-23 nükleotid uzunluğunda çift sarmallı RNA molekülleridir. Thomas Tuschl, sentetik siRNA'nın memelilerde RNA girişimini (RNAi) tetiklediğini keşfetmiştir, bu da kontrollü gerçekleşen RNAi'nin biyomedikal araştırmalar ve ilaçlar geliştirmek için kullanılmasının yolunu açmıştır. Yalın siRNA'ların kanda kararsız olduğu ve ribonükleazlar tarafından parçalanabildiği iyi bilinmektedir (Elbashir vd., 2001; Nikam ve Gore, 2018; Whitehead vd., 2009).

Doğal bir biyolojik mekanizma olan RNA girişimi (RNAi), hastalıkların tedavisinde benzersiz, yenilikçi bir terapötik bir yaklaşımdır. Bu eşsiz terapi stratejisi, kısa firkete RNA (shRNA), siRNA ve mikro RNA (miRNA) gibi bir proteinin ekspresyonunu azaltırken tamamlayıcı bir mRNA dizisinin bozulmasını indükleyebilen bir dizi varyasyonu içerir. En yaygın olarak tanıtılanlar, 1998 yılında David Baulcombe tarafından keşfedilen siRNA ilaçlarıdır. Şaşırtıcı olarak, geleneksel antikor ilaçlara göre daha hedefe yönelik olan siRNA'lar, tek bir hedef genin mRNA dizisini tamamlamak üzere hedeflenebilir ve hedef genin ekspresyonunu tam olarak bozabilir (Baulcombe, 2000; Zuckerman ve Davis, 2015). siRNA nanomateryal dağıtım sistemi Şekil 2.5'te verilmiştir.



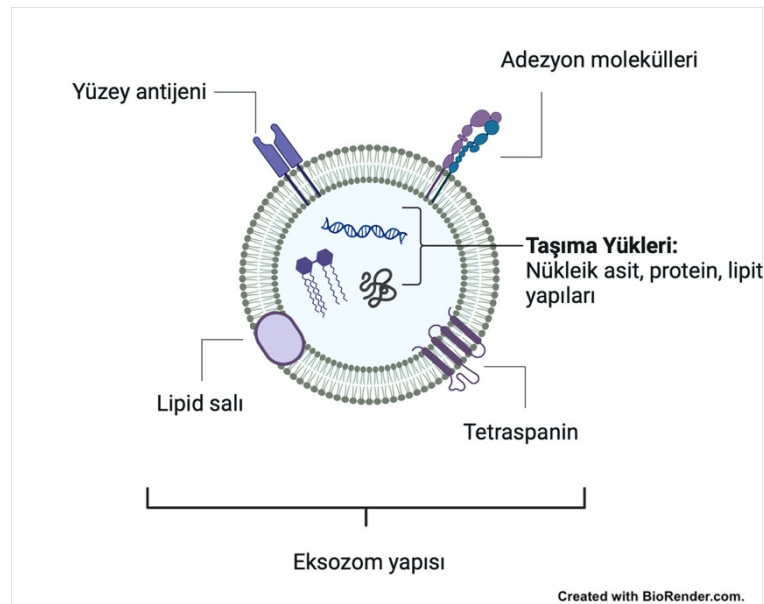
Şekil 2.5. siRNA nanomateryal dağıtım sistemi.

Buna ek olarak, siRNA'nın *in vivo* protein ekspresyonunun transkripsiyon sonrası modülasyonu, geleneksel kimyasal ilaçlara göre daha hedefli ve sürdürülebilirdir. Buna ek olarak, geleneksel ilaçların tedavisi sırasında gen patojenik mutasyonların etkisini ortadan kaldırabilir. Son zamanlarda, siRNA ilaçları kullanılarak, TME'nin modüle edilmesinde, diğer immünoterapilerin etkinliğinin artırılmasında ve tümör hücrelerinin öldürülmesinde mükemmel sonuçlar elde edilen bazı klinik çalışmalar yürütülmüştür (Chen vd., 2023; Shen vd., 2018; Wang vd., 2021).

2.10 Eksozomlar

Ekstraselüler veziküller, hücreden oluşum ve büyüklüklerine göre sınıflandırılırlar. Hücre zarından doğrudan hücrenin dışına doğru salgılan mikroveziküller, apoptoz sonucunda meydana gelen apoptozomlar, retrovirüs benzeri vezikül yapılar ve hücre membranından dolaylı olarak oluşan eksozomlar olarak sınıflandırılır.

Eksozomlar, işlevleri son yıllarda keşfedildiği için ilgi çekici olmuştur. Eksozomlar hücrelerarası taşıma ve iletişimdendir sorumlu sistemlerdir. Eksozomlar normal veya kanserli hücrelerden salgılanabilirler. Salgılandıkları hücreye özgüdürler. Eksozomlar nano ölçekte meydana geldikleri için, hedef hücrelerce kolay bir şekilde tanınırlar ve hücre içine alınırlar (Ersöz vd., 2016). Eksozom yapısı Şekil 2.6'daki gibidir.



Şekil 2.6. Eksozom yapısı.

İlk araştırmalarda, eksozomlar yalnızca hücrelerden atık götürdükleri gösterilmiştir. Ama son yıllarda yapılan çalışmalara bakıldığında eksozomların, kargo içeriklerinin yalnızca atıklardan değil hücreler arası iletişim, sinyal gönderimi gibi oldukça önemli işlerde kullanılacak, nükleik asitleri, proteinleri, miRNA/mRNA' yı, nükleoproteinler ve çeşitli enzimleri taşıdıkları bulunmuştur (Akers vd., 2013; Van der Pol vd., 2012).

Eksozomlar, eritrositlerden, trombositlerden ve kanserli hücreler gibi vücuttaki tüm hücrelerden salgılanabilmektedir. Kandan, idrar, ağız içi salgısından, amniyotik sıvıdan, beyin-omurilik sıvısından, eklem sıvısından, nasal salgılardan, anne sütünden yani tüm vücut sıvılarında oluşabilirler (Aatonen vd., 2014; Danesh vd., 2014).

Eksozomlar kanser hücrelerinde, bağışıklık sistemini atlatarak immün hücrelerin inhibisyonuna, tümör mikro ortamında anjiogenezin çoğalmasına, ilaç direncine, invazyon ve metastaza neden olabilmektedir. Eksozomların taşıdığı kanser sinyal proteinleri, ligandlar, enzimler ve miRNA'lar kanserli hücrenin ilerlemesine ve yayılmasına imkan sağlarlar. Eksozomların, kanser de dahil çoğu hastalık için tanı ve tedavide potansiyel biyobelirteç olma özelliği göstermektedir. Eksozomlar taşıdıkları kargoların içeriklerini (özellikle mRNA ve miRNA) hastalıklar için tanıda önemlidir. Salgılandıkları hücre duvarları ve sitoplazmik özellikleri özgün şekilde taşırlar. Eksozomlar canlı vücutundaki tüm sıvılardan meydana gelebilir, bu da çoğu hastalığın tanısında kolaylaştırıcı nitelikte biyobelirteç olarak araştırmaları mümkün yapar (Ersöz vd., 2016).

Son çalışmalarda, kanser hücrelerinin mikroçevreleri ile arasındaki etkileşimin (tümör hücrelerinin kendileriyle ve stromal hücrelerle etkileşimi vb.) tümör evrimine katkıları gösterilmiştir (Nazemi ve Rainero, 2020; Pernot vd., 2022).

Salgılanan moleküller arasında, her hücre tarafından hücre dışı olarak salınan herhangi bir küçük lipid çift katmanıyla sınırlı parçacıkları tanımlamak için kullanılan eksozomlar bulunmaktadır. Eksozomların yüzey reseptörleri, fizyolojik davranışlarındaki değişikliklerle alıcı hücreler tarafından hedeflenmesini ve yakalanmasını sağlar. Bu eksozomların insan hastalıklarında, özellikle kanserli hücrelerde iletişimde iyi bir araç olduğu ispatlanmıştır (Colombo vd., 2014; Latifkar vd., 2018; Margolis ve Sadovsky, 2019; Naito vd., 2017; Shah vd., 2018; Xu vd., 2018).

Eksozomlar hücreSEL kaynaklı hücre dışı veziküllerdir. Çapları 30-100 nm arasındadır ve bunlar, doğal nano boyutlu dağıtım sisteminin yeni nesli olarak görülmektedir. Farklı hücrelerden salgılanan eksozomlar, hücreler arasındaki iletişimde çok önemli olan sinyal bileşenlerini (proteinler ve nükleik asit gibi) taşıır.

Doğal lipozomlar olan eksozomlar endojen biyomolekülleri taşırlar, biyoyumludurlar, *in vivo* ve *in vitro* ortamda kargo taşıyabilirler. Eksozom yüzeyinde yapılan doğal modifikasyonlar, ilaç yükleme kapasitesiyle hedeflemeyi geliştirebilir. Özellikle eksozomlar serum proteinleriyle zayıf bir şekilde reaksiyona girerek taşıdıkları kargonun yarı ömrünü uzatıyor (Li vd., 2022).

Eksozomlar, zarlardan oluşan ve hücreler tarafından yayılan bifosfolipid cisimciklerdir. Eksozomlar ilk olarak 1983 yılında, kültürlenmiş koyun eritrositlerinin süpernatantında keşfedildi ve salgılanan çöp olarak kabul edildi. Eksozomlar tümör hücrelerinden, bağışıklık hücrelerinden, kök hücrelerden ve endotelial progenitör hücrelerden salgılanarak kan, beyin omurilik sıvısı, tükürük ve hatta idrardan tespit edilebildiği keşfedildi. Artık eksozomların çapının 30-100 nm olduğu, lipidler (kolesterol, sfingomiyelin ve seramid) açısından zengin olduğu ve DNA, kodlamayan RNA, mRNA veya protein gibi aktif moleküllerle dolu olduğu genel olarak kabul edilmektedir (Boyiadzis ve Whiteside, 2015; Kowal vd., 2014; Lässer vd., 2011; Pan ve Johnstone, 1983).

İdeal bir ilaç taşıyıcı molekülün sistematik, kontrollü ve hedefli bir şekilde salım yapması gerekir; bağışıklık sistemi ile uyum içinde olmalı ve yüklenen ilaçlar korunarak hedef hücrelere ulaştırılmalıdır. Bu özellikler sayesinde taşıyıcı molekül ilaç etkinliğini değıştirmeden biyoyumlu ve biyolojik olarak bozunabilir olmalıdır (Allen ve Cullis, 2004). Eksozomlar bu koşullara tam olarak uygundur. İnsan vücudunda bulunan doğal bir lipozom olan eksozomlar, verimli yükleme kapasitesi ve terapötik ilaçların birlikte iletilme yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir (Yang ve Wu, 2018).

Eksozomların yapısı genetik materyal, proteinler ve lipidlerce zengindir, tümör mikro ortamında (TME) bulunan donör hücreler ve hedef hücreler için gerekli olan iletişim bilgilerini taşırlar. Tümörden türetilen eksozomların aynı zamanda TME ve kanser başlangıcıyla da güçlü ilişkileri olduğu bulunmuştur. Bu nedenle de tümörden türetilen

eksozomlar, yüksek kanser hücresi hedeflenmesi ve terapötik etkinliği, düşük toksisitesi ve geçirgenliği olan doğal ilaç taşıyıcı sistemler olarak tasarlanabilir (Li ve Nabet, 2019; Tarasov vd., 2021). Önceki araştırmalarda, eksozomların bağışıklık sistemi hastalıkları için tedavide kullanılabileceği bulunmuştur. Otoimmün hastalıkların geleneksel tedavileri, sınırlı hedefleme yeteneği ve ilaçların uygun olmayan farmakokinetik davranışı nedenleriyle zayıf terapötik etkiyle sonuçlandığından dolayı, eksozom taşıyıcıları biyolojik maddeleri veya diğer inflamasyon inhibitörlerini verimli bir şekilde yükleyebilir ve bunları hedefe iletebilir. Eksozomlar otoimmün hastalıklara karşı mücadeleyi destekleme konusunda umut verici umutlar sağlar (Tavasolian vd., 2020; Zhou vd., 2020).

2.10.1 Eksozomlar ve biyokorona

Eksozomlar ve mikropartiküller de dahil olmak üzere hücre dışı kesecikler (EV'ler) üzerine yapılan araştırmalarda, son birkaç yılda önemli bir artış gözlenmiştir. EV'ler, fonksiyonel bileşenlerin hücrelere taşınmasında önemli bir rol oynar ve hücreler arasındaki iletişimi sağlar.

Bu tür bir iletişimin sadece çok hücreli organizmalar için gerekli olmadığı, aynı zamanda hastalıkların patogeneğinde de rol oynadığı giderek daha fazla kabul edilmektedir. EV'ler serum gibi biyolojik sıvıların içinde bulunur. İdrar ve anne sütü, çoğu hücre tipi ise farklı koşullar altında eksozomları salgılama yeteneğine sahiptir. Bu nedenle, şartlandırılmış ortam, biyolojik çalışmalar için EV'leri izole etmek için yaygın olarak kullanılan bir kaynaktır. Eksozomların protein bileşimleri, biyogenezlerine ilaveten köken hücrelerin fizyolojik koşullarına bağlıdır (Mathivanan vd., 2012; Mathivanan ve Simpson, 2009; Jella vd., 2018).

Eksozom yapılarının bazı özellikleri, eksozom kaynağının orijinine bağlı olarak bazı farklılık gösterebilir. Bundan dolayı, eksozomların biyokimyasal özelliklerinin çeşitli kaynaklardan elde edilme yollarını da araştırmak önem arz eder. Nanoboyuta sahip hücre dışı kesecik olan eksozomlar, neredeyse her hücre türü tarafından salındığı bilinmektedir. EV'lerin boyut, içerik ve işlev bakımından heterojen olduğu dikkate alındığında, eksozomların mikropartiküller gibi diğer EV'lerden ayrılması zordur. Yine de literatürde hücre kültüründe izole edilen eksozomların karakterizasyonuna yönelik modeller iyi dizayn edilmiştir (Kim vd., 2021).

Eksozomların iyi ilaç taşıma performanları ile birlikte bir diğer konu ise eksozomların nanoyapılarla ile birlikte protein korona oluşturabilme olasılığıdır. Vücut içindeki eksozomlar çevresinde protein korona oluşumunun altında yatan mekanizma hala açıklığa kavuşturulamaması, bu durumu araştırmak adına daha da önemli kılmaktadır. Molekül yapıları ile eksozom yapıları arasında meydana gelen adsorplama yeteneği ve serum proteinlerinin kişiden kişiye farklılıklar da göz önünde bulundurulduğunda, korona kalınlığının kayda değer ölçülerde farklı olacağı, eksozomal kinetik, biyodağılım, yerleşim ve internalizasyonun faktörlerini de etkileyebileceği literatürde belirtilmiştir (Heidarzadeh vd., 2023).

Ayrıca, elektrostatik etkileşimler ve protein toplanması yardımı ile sulu fazlardaki eksozomların etrafında protein korona oluşumu da literatüre verilmiştir (Tóth vd. 2021). Yine de, biyoakışkanlarda protein korona oluşumuna katkıda bulunan parametreler hakkında yeterli bilgi olmayışından dolayı hem teorik hem deneysel açıdan tam anlamı ile olgunlaşmamıştır (Heidarzadeh vd. 2023).

2.11 Eksozom İzolasyonu ve Saflaştırılmasına Yönelik Stratejiler ve Teknolojiler

2.11.1 Eksozomal biyogenez

"Eksozom" terimi, endozomal yolda çok kesecikli cisimcikler aracılığıyla salgılanan hücre dışı keseciklerin bir alt tipini tanımlamak için kullanılmaktadır. Diğer alt tipler, apoptotik koşullar altında hücrelerce üretilen apoptotik cisimcikler ve tomurcuklanmayla plazma zarından dışarıya doğru oluşan mikropartiküllerdir (Chen vd., 2022).

Bu üç alt tip birbirleriyle kıyaslandığı zaman, boyut, işlev ve biyolojik köken bakımından farklılık göstermektedir (Abhange vd., 2021).

Eksozomlar, stres koşullarına bağlı olarak birçok faktör tarafından uyarılabilir (De Toro vd., 2015). Eksozomal biyogenez erken endozomlarla başlar (Lin vd., 2020).

Hücre zarı belirli bir faktörün etkisiyle endositoza uğrayarak içeriye doğru uzanmaya başlar. Böyle oluşan iç zara erken endozom denir (Lee vd., 2012). Erken endozomlar hücrede (hücrenin çevresinden çekirdeğe) hareket etmeye devam ederek yavaş yavaş olgunlaşır (Keller vd., 2006; Théry vd., 2002).

Erken endozomlar olgunlaşarak geç endozomlar olduğunda, iç vücut zarı, sitoplazmanın bazı bölgelerini ve bazı molekülleri (örneğin, nükleik asitler, golgi proteinleri ve hücre çekirdeğinden gelen proteinler) kapsülleyebilen çöküntüler meydana getirecek ve böylece intralüminal veziküller oluşacaktır (Chen vd., 2022).

2.11.2 Yaygın ekzozomal ayırma teknikleri

Eksozomlar erken teşhis ve tedavide yeri doldurulamaz bir rol oynasa da boyutları küçüktür (30-150 nm), yoğunluğu düşüktür (1,13-1,19 g/ml) ve benzer bileşenlerle (örn. hücre parçaları, proteinler) ayrılmaları konusunda büyük zorluklar oluşturan vücut sıvıları karışmışlardır (Cui vd., 2018; Lin vd., 2020).

Eksozomların biyolojik aktivitesinin çeşitli ayırma metotlarından etkilendiği de literatürde belirtilmiştir (Paolini vd., 2016). Kısaca, standardı oturmuş ayırma ve kantitatif metotların hem eksozomların incelenmesi hem de klinik uygulaması için son derece önemlidir. Mevcut ayırma teknolojilerini kavramak, daha verimli eksozom ayırma teknolojilerini geliştirmenin de temelidir. Yaygın ayırma yöntemleri temel olarak ultrasantrifüjleme, boyut eleme/ayırma kromatografisi, ultrafiltrasyon, polimer çökeltme ve immünoafiniteyi içerir (Chen vd., 2022).

Bu tekniklere aşağıdaki bölümlerde değinilecektir.

2.11.2.1 Ultrasantrifüjleme

Ultrasantrifüjleme metodu en yaygın teknoloji olarak göze çarpmaktadır. Araştırmacıların büyük çoğunluğu eksozomları ayırmak için ultrasantrifüjlemeyi kullanmaktadır (Zarovni vd., 2015). Ultrasantrifüjleme metodu, eksozomlar ve safsızlıklar arasındaki yoğunluk ve boyut farklılığı ilkesine dayanmaktadır. Belirli adımlar Şekil 3.4'te gösterilmiştir.

İlk olarak numuneler sırasıyla 300 g, 2000 g ve 10.000 g'de olmak üzere santrifüj edilir. Ardından büyük hücreler, hücre parçaları ve ölü hücreler uzaklaştırılabilir (Théry vd., 2006). Bazı yöntemlerde, filtrasyon işlemi, eksozomların büyük ölçekte hazırlanması için düşük hızlı santrifüj aşamalarının yerini alabilir (Ji vd., 2008; Théry vd., 2001).

Bu işlemlerin ardından süpernatant, eksozomları saflaştırmak için daha yüksek hızlarda (>100.000g) iki defa ultrasantrifüjlenir. Ultrasantrifüjlemede yalnızca benzer yoğunluk ve boyuttaki maddeleri konsantre edebileceğini, ancak eksozomları dikkatli bir şekilde ayırt edemediğini belirtmek de gerekir. En yaygın yöntem olan ultrasantrifüjleme, bazı avantajlara sahiptir; çoğu numuneyi ayırmak için uygundur ve düşük maliyetlidir. Ancak, ayırma işleminin tamamı uzun süren bir prosese sahiptir (> 4 saat) ve tekrarlanabilirlik açısından zayıf/kararsız olabilir. İkinci olarak, birkaç tur santrifüj işlemine rağmen çökeltide hala birçok safsızlık bulunabilir (ortak saflaştırıcı protein agregatları, viryon, hücre altı organeller), bunlar daha sonraki kütle spektrometresi veya protein kantitasyonunun sonuçlarını etkileyebilir. Son olarak, yüksek hızlı santrifüjlemenin zayıf taraflarından biri eksozomlara zarar verebilir ve biyolojik aktivitelerini azaltabilme riski olduğu da unutulmamalıdır (Jeppesen vd., 2014; Tauro vd., 2012; Zhang vd., 2018).

Yoğunluk gradyanlı santrifüjleme işlemi, ultrasantrifüjemeye bağlı olarak geliştirilmiş bir ayırma metodudur. Ultrasantrifüjlemeden farklı olarak, yoğunluk gradyanlı santrifüjleme işlemine, sakkaroz ve iyodiksanol gibi farklı yoğunluklardaki iki veya daha fazla ayırma ortamından yararlanılmasıdır (Tauro vd., 2012). Buradaki yöntemin önemli bir avantajı daha yüksek izolasyon saflığına sahip olmasıdır. Ancak, ön hazırlıklar, yavaş işlemler ve daha uzun santrifüj sürelerine (>16 saat) ihtiyaç vardır, bu durum da klinik uygulamasını sınırlamaktadır (Gupta vd., 2018; Liu vd., 2021).

2.11.2.2 Ultrafiltrasyon

Ultrafiltrasyon yöntemi, moleküler boyuta bağlı bir ayırma yöntemi olup ve eksozomların ayırma işlemi için en basit yöntemlerden bir tanesi olarak öne çıkar. Burada, eksozomlar farklı gözenek boyutlarına veya moleküler ağırlık kesmesine sahip olan bir veya daha fazla filtre membranından yabancı maddelerin uzaklaştırılması yardımı ile ayrılır. Daha büyük kirletici madde, filtreleme membranı tarafından niceliksel olarak geride tutulurken, daha küçük diğer bileşenler (eksozomlar), süzüntüyle birlikte filtreleme membranı yapısından geçebilir (Li vd., 2017).

İtici güce bağımlı olarak ultrafiltrasyon işlemi, elektrik yükü, santrifüjleme ve basınç olarak sınıflandırılabilir. Ultrafiltrasyon işlemi, eksozomların ayırımında en basit metotlardan biridir. Eksozomlar, yüksek maliyetli özel ekipmanlar ve zararlı kimyasallara gerek olmadan büyük hacime sahip sıvılardan ayrılabilir. Unutulmaması gereken önemli bir nokta ise filtreleme zarının yüzeyindeki herhangi bir tıkanma sonucu düşük bir geri kazanıma da neden olabilir (Xu vd., 2018).

2.11.2.3 Boyut ayırma kromatografisi

Ultrafiltrasyon ilkesine benzer şekilde olan boyut ayırma kromatografisi, moleküler boyut farkına dayalı bir ayırma teknolojisidir. Spesifik adım olarak, numune gözenekli boncuklar (örneğin, Sephadex, Sepharose, Sephacryl, BioGel P) içeren kolona eklendiğinde, daha büyük parçacıkların jel gözeneklerine girememesi ve elüsyon hızının daha hızlı olması ile açıklanabilir (Yang vd., 2020).

Nispeten küçük boyuta sahip parçacıklar bir labirente benzer şekilde gözeneklere girebilir ve ayırma hedefine ulaşmak için elüsyon hızı daha yavaş olacaktır. Ultrasantrifüjlemenin güçlü kuvvetinden farklı olarak, bu yöntemde eksozom ayırımı yalnızca yerçekimi veya düşük hızlı santrifüjleme ile gerçekleştirilebilir ve eksozomların biyolojik işlevi korunur (Batrakova ve Kim, 2015).

Farklı araştırmalar, ultrafiltrasyon ile boyut ayırma kromatografisi kombine edilmiş yöntemin daha verimli bir eksozom saflığına sahip olabileceğini göstermiştir. Bu yöntem büyük ölçekli örnekler için basit, uzun ömürlü ve ekonomik bir yöntemdir.

2.11.2.4 İmmünoafinite

İmmünoafinite yöntemi, antijen-antikor spesifik reaksiyonuna bağlı biyolojik parçacıkların ayrılması ve saflaştırılması için kullanılan bir yöntemdir. Eksozom membranlar, proteinler ve reseptörler bakımından zengindir. Bu ortak proteinler (tetraspaninler, anneksinler olmak üzere), eksozomların spesifik olarak izole edilebilmesi için antikorlara bağlanabilir. Ayrıca, EpCAM ve antiA33 gibi eksozomlarda bulunan spesifik proteinlerin hedeflenmesi ile tümörden türetilmiş eksozomların etkin bir biçimde izolasyonu da mümkündür.

İmmünoafinite metodu yüksek özgüllük ve iyi bir izolasyon saflığı derecesine sahiptir ve eksozom alt birimlerini de izole edebilir. Fakat, antijen-antikor bağlanmasında bir zaman dilimi gerektiğinden bu teknik de zaman alıcıdır. Bunların dışında, maliyetli olması, reaktif ve saklama koşullarının zor olması gibi dezavantajları içinde barındırır. Bu yöntem, yüksek saflığa veya belirli eksozom alt sınıflarına ihtiyaç duymayan araştırmacılar için en uygun seçim değildir (Chen vd., 2022; Mathivanan vd., 2010; Ruivo vd., 2017).

2.11.2.5 Polimer çöktürmesi

Polimer çöktürme yöntemi geçmişte virüsleri veya diğer biyolojik makromolekülleri izole etmek için sıklıkla kullanılmıştır (Zeringer vd., 2015).

Bu teknik son zamanlarda eksozomların izolasyonunda popüler hale gelmiştir. Bu yöntemde kullanılan reaktifler protamin, asetat, protein organik solvent çökeltme, polietilen (PEG) gibi reaktifleri içerir. Bunların arasında PEG en çok kullanılanıdır (Brownlee vd., 2014; Deregibus vd., 2016; Gallart-Palau vd., 2016; Ryu vd., 2020).

PEG'e bağlı yöntemde, eksozomların çözünürlüğü, eksozom çökmesine müsaade edecek şekilde azaltılarak oluşturulur. Ardından, eksozomlar düşük hıza sahip santrifüjleme ile elde edilebilir. Bu yöntemde, karmaşık cihazlar, zaman alıcı prosedürler olmadığından kullanımı da basittir. Büyük hacimdeki numunelerde etkişn olarak kullanılabilir ve diğer ayırma teknikleri ile de kombinasyonu kolaydır. Buradaki yöntemde elde edilen eksozomlar, lipoproteinler veya virüs parçacıkları ile kontaminasyona karşı hassastır. Bu durum sonraki analiz işlemleri için (proteomik, kütle spektrometresi gibi) sıkıntı yaratabilir. Özellikle, son yıllarda çok fazla sayıda araştırmacı, bu eksiklikler ile başa çıkmak için buradaki yöntemi diğer ayırma teknikleri birleştirmiştir (Ryu vd., 2020).

2.11.2.6 Eksozom ayırma kitleri

Eksozomların yavaş yavaş araştırmanın odağı haline gelmesiyle birlikte çeşitli ticari kitler ortaya çıktı. Bu durum kitlerin uygulamasının giderek daha kapsamlı hale gelmesine neden oldu.

Eksozomun izolasyon kiti özel bir teknoloji değildir ve kimyasal çöktürme, immünoafinite, boyut dışlama kromatografisi, santrifüjleme gibi prensipler yukarıda ayrıntılı olarak açıklanmıştır. Ticari ürünlerin kullanımının kolay olması, ayrıca özel ekipman(lar) gerektirmemesi ve özellikle donanımı yetersiz olan laboratuvarlar açısından son derece uygundur. Bu ticari kitler, eksozomları farklı biyolojik numunelerden izole edebilme kapasitesine sahiptir (örneğin, serum, plazma, CSF), fakat elde edilen eksozom saflıkları, miktarları ve boyut dağılımları önemli bir ölçüde farklı olabilir (Helwa vd., 2017; Soares Martins vd., 2018) . İlgili araştırmacılar için deneyin amacına uygun bir ürün seçmek çok önemlidir. Benzer şekilde kitin en önemli noktası pahalıdır ve çoklu örnekler uygun değildir (Chen vd., 2022).

2.11.3 Gerçek ve büyük ölçekli üretim

Çok sayıda patolojik, biyolojik ve fizyolojik araştırmada bilim adamları, hem genlerin hem de ilaçların taşıyıcıları için eksozomların klinik uygulamasına ilişkin önemli başarılar elde ettiler. Eksozomların ayrılması/saflaştırılmasında birçok kayda değer gelişmeye rağmen, büyük ölçekte eksozom üretimi geliştirmek hala temel zorluklardandır. Bu zorluk, eksozoma bağlı biyomedikal bazı tedaviler ve araştırmaların sınırlarını da daraltmaktadır. Bu nedenle tekrarlanabilir, basit ve iyi üretim uygulamaları ile (GMP) uyumlu bir üretim platformu arzu edilmektedir (Chen vd., 2022).

Eksozomların büyük ölçekteki elde edilmesine yönelik prosedürler sıklıkla birden fazla istiflenmiş hücre kültürünün (örneğin, T175 veya T225), büyük sabit yataklı biyoreaktörler veya karıştırılmalı tanklı biyoreaktörlerin kullanılması ile elde edilir (Colao vd., 2018).

Süreç karmaşık kalite kontrolleri ile birlikte, doğrulama, nicelik belirleme ve karakterizasyon aşamalarını içinde barındırır. Bununla birlikte, küçük ölçeğe sahip laboratuvar izolasyonundan büyük ölçekteki ticari üretim şekline geçiş ve deneysel bir aşamadan ticari bir ürüne geçiş de dahil olmak üzere birçok konunun daha fazla dikkate alınmasını gerekmektedir (Whitford ve Guterstam, 2019). Genellikle, büyük ölçekli üretimlerdeki temel anahtar, yüksek verimde ve minimum maliyetlerde eksozomal iyileşme oranının ve saflığının iyileştirilmesi olduğu unutulmamalıdır (Chen vd., 2022).

Son olarak, terapötik eksozomların daha fazla araştırılması ve klinik uygulaması, tasarlanmış eksozomların büyük ölçekli GMP üretiminden ayrılamaz. Bu nedenle, GMP protokollerinin daha da geliştirilmesi, daha otomatik ve dijital üretim süreçleri ve tasarlanmış eksozomların büyük ölçekli üretimi için sıkı kalite kontrol sistemleri esastır (Chen vd., 2022).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

Nanomateriyal sentezinde kullanılan N-(florenilmetoksikarbonil)-L-lisin (Fmoc-Lys) Merck (Darmstad, Almanya), çözücü olarak kullanılan Hekzafluoro-2-propanol (HFIP) CovaChem (Illinois, ABD)'den temin edildi. Çapraz bağlayıcı olarak kullanılan gluteraldehit (GA) ve Fmoc-Lys-Ca²⁺ sentezinde kullanılan Kalsiyum Nitrat (Ca(NO₃)₂) Sigma-Aldrich (Darmstad, Almanya)'den satın alındı.

Nanomateriyallerin yıkama işlemleri soğutmalı santrifüj cihazı (Beckman Coulter, Allegra 64R) ile yapıldı. Nanomateriyallerin agregasyonunun önüne geçmek için Bandelin Sonorex sonikatör cihazı kullanıldı.

Eksozom çalışmalarında kullanılan malzemeler; AmSil 20 amorf silika, ABD, Nyacol'den satın alınmıştır, kimyasallar Sigma Aldrich/Merck'ten (Darmstadt, Almanya), hücre kültürü ortamları (baş ve boyun kanseri olan FaDu ve Pica hücre dizileri) ve reaktifleri Gibco/Thermo Fisher Scientific'ten (Dreieich, Almanya) temin edilmiştir. Tek kullanımlık malzemeler Greiner Bio-One'dan (Frickenhausen, Almanya) satın alınmıştır ve deneylerde kullanılan su, Barnstead (Dubuque, IA, ABD) ROPure LP® ters ozmoz ünitesi kullanılarak saflaştırılmıştır.

3.2 Peptit Temelli Nanomateriyallerin Sentezi

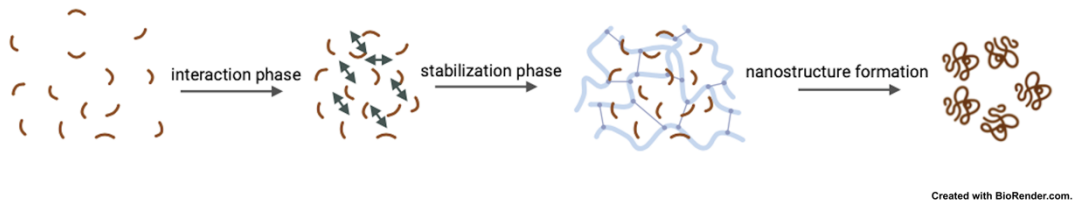
Protein bazlı kendiliğinden düzenlenme (self-assembly) yöntemiyle sentezlenen nanoyapılar kovalent olmayan (non-kovalent) etkileşimlerle meydana gelirler. Bu oluşumun gerçekleşmesi için genellikle hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları baskın güçler olarak tanımlanırlar. Burada bahsedilen zayıf etkileşimler, ortamdaki fizyolojik değişimlerden kolayca etkilenirler ve moleküller ortam şartlarındaki bu değişikliklere cevaben üçboyutlu şekillerini değiştirirler ya da agregate olurlar. Fmoc-Lys temelli nanomateriyaller da kendi kendine düzenlenme ile meydana gelirler ve bu anlatılan sebepten dolayı stabil değildirler. Bu tez çalışmasında, çapraz bağlayıcı olarak gluteraldehitin (GA) kullanılmasıyla, daha stabil Fmoc-Lys temelli NM'ler sentezlenmiş ve kovalent çapraz bağlama yöntemi kullanılmıştır.

GA peptit yapılarının kendi kendine düzenlenmesinde rol oynayan bir çapraz bağlayıcıdır. Gluteraldehit, peptit yapılarının kendi kendine düzenlenmesi esnasında stabilizör olarak da davranabilmektedir (Mandler ve Kraus-Ophir, 2011; Perween ve Chandanshive, 2013).

Azometin ($\text{CH}=\text{N}$) grubunu taşıyan ve genellikle $\text{RCH}=\text{NR}_1$ yapısı ile formüle edilen bileşikler “Schiff Bazı” bileşiklerdir ve bu bileşikler, primer amin ve karbonil bileşikleri arasında gerçekleşen kondensasyon tepkimesi sonucu oluşurlar.

Aldehit grubu (ya da keton) ve birincil amino grubu içeren bileşikler arasındaki reaksiyon Schiff bazı reaksiyonu olarak adlandırılır. Proteinlerin ve polimerlerin çapraz bağlanmasında kullanılan bir metottur. Reaksiyon sonucunda Schiff bazı ($\text{C}=\text{N}$) oluşur. Bu tez çalışmasında Fmoc-Lys dipeptidi ile gluteraldehit kovalent çapraz bağlanarak, dipeptidin amin ucu ile gluteraldehit molekülünün aldehit ucu arasında Schiff bazı ($\text{C}=\text{N}$) oluşmaktadır.

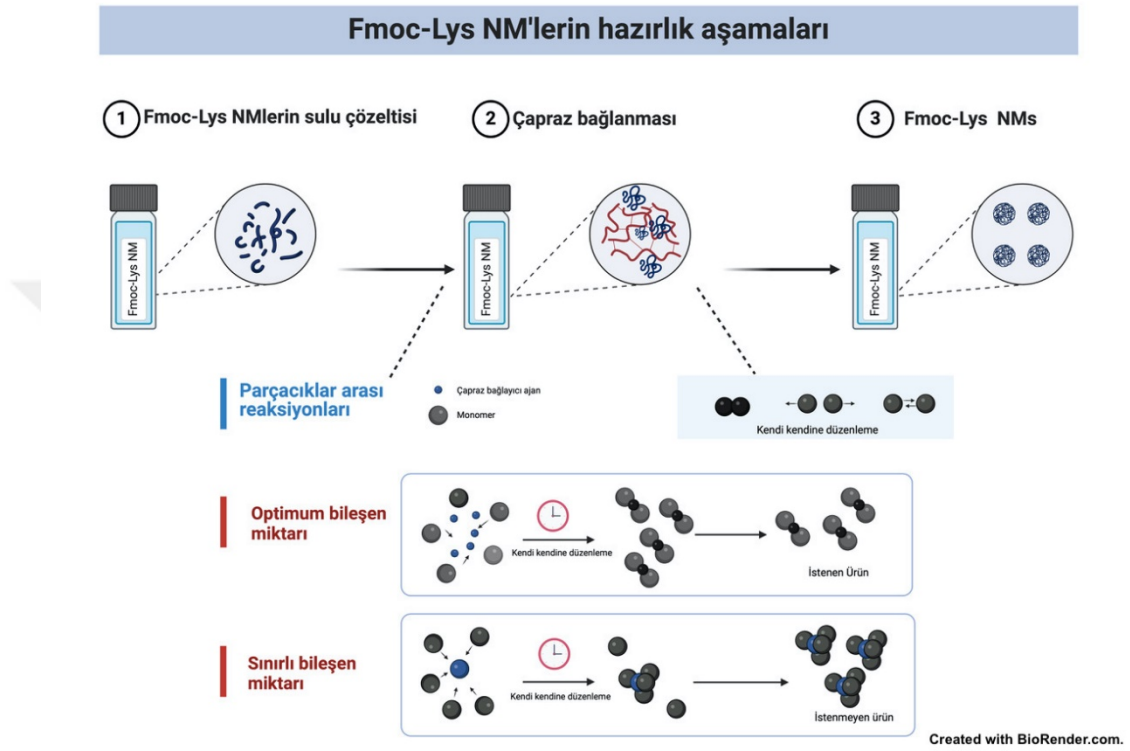
Nanoyapıların fizyolojik olarak stabil olmasını sağlayan 2 önemli nokta vardır. Nanoyapıların kendi kendine düzenlenmesi (self-assembly) ve kovalent olarak çapraz bağlanması ile daha stabil nanoyapılar oluşur (Mandler ve Kraus-Ophir, 2011; Perween ve Chandanshive, 2013). Nanomateryal oluşumu iki fazda oluşur. Bunlardan ilki Fmoc-Lys dipeptidi GA ile Schiff bazı reaksiyonu ile çapraz bağlanmakta ve dimerler oluşturmaktadır (Zhang vd., 2015). Bu dimerler nanomateryalin yapı taşıdır. İkinci olarak da meydana gelen bu yapı taşları sulu fazda hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimlerle Şekil 3.1’deki gibi kendi kendine düzenlenerek nanomateryalleri oluşturur.



Şekil 3.1. NM’lerin oluşum aşamaları.

Bu çalışmadaki deneylerimizde, çapraz bağlanma süreleri ve çapraz bağlayıcı miktarları kontrol edilerek nanomateryalin boyutu üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Fmoc-Lys temelli nanomateryallerinin sentezini kısaca şöyle özetleyebiliriz: Fmoc-Lys molekülünün amin grubu ile çapraz bağlayıcı olarak yararlanılan gluteraldehit molekülünün aldehit grubu arasında Schiff bazı (C=N) temelli kovalent çapraz bağlı moleküller Fmoc-Lys nanomateryalleri (Fmoc-Lys NM) oluşturmak üzere Şekil 3.2'deki gibi kendiliğinden bir araya gelir.



Şekil 3.2. Fmoc-Lys NM'lerin oluşumu.

Fmoc-Lys temelli NM'lerin sentezi için, Fmoc-Lys dipeptiti 1,1,1,3,3,3-heksafloro-2-propanol (HFIP) içerisinde çözünmesiyle nanomalzeme oluşumuna yönelik bir stok çözelti hazırlandı (Stok çözelti: 0,1 g/mL konsantrasyonda 9 mg Fmoc-Lys/ 90 µL HFIP çözeltisi). Hazırlanan bu stok çözeltiye 1,8 mL, %25'lik gluteraldehit çözeltisi ilave edildi. Hazırlanan bu çözelti eşit olarak üç vial (her bir çözelti 630 µL'lik olacak şekilde) bölündü. Çizelge 3.1'de verilen 3 farklı çapraz bağlanma süresi sonunda her bir vial 2,4 mL saf su eklenerek gluteraldehitin aktivitesi azaltıldı ve kendiliğinden düzenlenme sürecini tamamlamak için gece boyunca karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda oluşan nanomateryaller 20.000 rpm'de (devir/dakika) 30 dakika boyunca santrifüj edildi.

Geriye kalan HFIP ve GA'nın olası sitotoksik etkisini ortadan kaldırmak için NM'ler 3 kez deiyonize su ile yıkandıktan sonra 3 mL saf su içerisinde dağıtıldı ve gerekli karakterizasyon çalışmaları için +4 °C'ye alındı. Bu işlem, Çizelge 3.1'de verilen Örnek 1, Örnek 2 ve Örnek 3 için farklı glutaraldehit miktarları (0,3 mL ve 0,9 mL) ile tekrar edilmiştir.

Çizelge 3.1. Fmoc-Lys temelli nanomateriyallerinin sentez parametreleri.

Örnek	Çapraz Bağlanma Süresi	Glutaraldehit miktarı (%25)
1	2 saat	0,3 mL / 0,6 mL / 0,9 mL
2	4 saat	0,3 mL / 0,6 mL / 0,9 mL
3	6 saat	0,3 mL / 0,6 mL / 0,9 mL

3.3 Peptit Temelli Nanomateriyallerin Karakterizasyonu

Çalışmanın bu bölümünde Fmoc-Lys temelli NM'lerin karakterizasyon çalışmaları yapıldı. Bu amaçla, sentezlenen Fmoc-Lys temelli NM'lerin taramalı elektron mikroskobu (SEM), geçirimli elektron mikroskobu (TEM), Zeta-sizer, ATR-FTIR ve LC-MS/MS analizleri gerçekleştirildi. Fmoc-Lys NM'lerin korona oluşum çalışmalarının analizi UV-VIS spektrofotometre cihazı (Shimadzu, Tokyo, Japonya, 1601 Model) ile yapıldı.

3.3.1 Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Nanomateriyallerin SEM analizleri (Carl Zeiss, EVO 50 EP) SEM cihazı ile yapılmıştır. Bu işlem için 5 µL nanomateriyal dispersiyonu, temiz bir cam yüzeye damlatılmış ve ardından azot gazının altında kurutulmuştur. Daha sonra altın kaplama yapılarak analizlere devam edilmiştir.

3.3.2 Geçirimli elektron mikroskobu (TEM)

TEM analizi, 100 kV hızlanma voltajında bir JEOL JEM-1230 üzerinde gerçekleştirildi.

3.3.3 MS analizleri

Sentezlenen nanomateriyallerin yapısal analizleri sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS/MS) (Thermo Scientific, TSQ Quantum Access Max) ile

gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan örneklerden belirli miktarlar alınarak (1 mL) üzerine dispersiyon ortamı olarak ilave edilen metanol (5 mL) içerisinde dağıtılmıştır. Daha sonra, bu çözeltilerin bir filtre (0.45 µm) yardımı ile filtrasyonu sağlanmış ve analizler için hazır hale getirilmiştir.

3.3.4 Dinamik ışık saçılması (DLS) analizleri

Fmoc-Lys NM'lerin DLS (dinamik ışık saçılması) analizleri yapılmıştır. Bu amaçla, 25 °C ve 173° geri saçılma açısıyla (viskozite: 0,8872 cP, refraktif indeks (RI): 1,33, dielektrik sabiti: 78,5) sonuçlar kaydedilmiştir. Derişimi 1 mg/mL olan Fmoc-Lys NM'lerin elektroforetik mobilitesi ölçülmüş ve ölçülen değerler Helmholtz-Smoluchowski eşitliği kullanılarak ζ -potansiyel ve boyut verilerine dönüştürülerek kaydedilmiştir.

3.3.5 Zayıflatılmış toplam yansıma-fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi (ATR-FTIR) analizleri

Fmoc-Lys NM'lerin sentezini fonksiyonel gruplar üzerinden göstermek için ATR-FTIR (Perkin-Elmer, Spektrum 100) spektrometre cihazı yardımı ile analizleri yapılmıştır. 600-4000 cm⁻¹ aralığında ve 4 cm⁻¹ lik boşluklarla spektrumlar alınmıştır.

3.4 Fmoc-Lys NM'lere Ca²⁺ İyonlarının Bağlanması

Dipeptit temelli Fmoc Lys NM'lerin hücresel etkileşimleri ve aynı zamanda yüzeydeki olası değişikliklikleri görmek için biyoyumlu olan ve canlılarda oldukça fazla bulunan Ca²⁺ iyonlarıyla etkileştirilmiştir. Ca²⁺ iyonları hücrelerin fizyolojik ve biyokimyasal birçok sürecinde görev alır (Brini vd., 2013a,b).

Bu tez kapsamında sentezlenen nanomateriyallerin yüzey yüklerini değerlendirmek amacı ile Fmoc- Lys temelli nanomateriyallere Ca²⁺ iyonları bağlanmıştır. Fmoc-Lys NM'ler Ca²⁺ iyonları ile etkileştirilmiş ve elde edilen yapıların zeta potansiyelleri belirlenmiştir. İlgili nanomateriyalin metal iyonu ile etkileşimi için öncelikle belirli bir derişimde Ca(NO₃)₂ hazırlanmış ve hazırlanan metal çözeltisinin nihai derişimi 10, 50, 100 ppm Ca(NO₃)₂ olacak şekilde ayarlanıp uygun fiziksel koşullarda (pH:5.0, 0,01 M sodyum asetat tamponu kullanılarak) nanomateriyaller ile 24 saat etkileştirilmiştir. Ardından bir kaç defa yıkama işlemine tabi tutulmuştur, böylece oluşan

nanomateryallerin ortamdan alınması için santrifüj edilip, alınan çökelti çalışmanın sonraki aşamaları için kullanılmak üzere hazır hale getirilmiştir. Yüzey yükleri zeta-potansiyelleri (mV) açısından değerlendirilmiştir.

3.5 Fmoc-Lys NM'lerin HSA, IgG ve DNA ile Etkileşimleri

NM'ler tipik olarak biyolojik moleküllere karşı reaktif olan yüzeylere sahiptir. Biyolojik sıvılara maruz bırakıldıklarında proteinler tarafından kaplanarak protein korona oluşturlar (Cedervall vd., 2007). Protein korona NM'lere 'biyolojik bir kimlik' kazandırır. Bir organizma içindeki hücreler, esas olarak plazma zarında bulunan reseptör proteinleri aracılığıyla, NM yüzeyinden ziyade bu protein korona katmanıyla etkileşime girerler (Monopoli vd., 2012).

Deneyssel çalışmalar kapsamında, Fmoc-Lys NM'lerin korona oluşumlarının incelenmesi için çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla, protein korona oluşumuna katkıda bulunan fiziksel olaylar hakkında bazı bilgiler almak için iki tür insan proteini (insan serum albümini (HSA) ve immüno globulin-G (IgG)) ve DNA molekülleri ile etkileşim çalışmaları yapılmıştır.

Fmoc-Lys-HSA etkileşimleri için, Fmoc-Lys NM'ler (1 mg/mL) alınarak pH 7,4, 0,01 M MOPS tamponunda hazırlanan HSA (35 mg/mL derişimine sahip) ile 2 saat boyunca etkileşime bırakılmıştır. Fmoc-Lys-IgG etkileşimleri için, Fmoc-Lys NM'ler (1 mg/mL) alınarak pH 7,4, 0,01 M MOPS tamponunda hazırlanan IgG (7 mg/mL derişimine sahip) ile 2 saat boyunca etkileştirilmeye bırakılmıştır. Fmoc-Lys-DNA etkileşimleri için Fmoc-Lys NM'ler (1 mg/mL) alınarak pH 7.4, 0.01 M MOPS tamponunda hazırlanan DNA (0,035 mg/mL derişimine sahip) ile 2 saat boyunca etkileştirilmeye bırakılmıştır. Çalışılan biyolojik molekül derişimleri için insan kanındaki derişimler dikkate alınmıştır.

Molekül etkileşimler için bir rotatör sistemi (Stuart® SB3) kullanıldı. Fmoc-Lys NM'lerin HSA, IgG ve DNA ile etkileşimleri 20 rpm'de hafif bir çevirme hızında gerçekleştirildi. Ardından, 20.000 rpm dönme hızında 15 dakika santrifüjlenip etkileşime girmiş olan Fmoc Lys-HSA, Fmoc Lys-IgG, Fmoc Lys-DNA NM'lerin çökmesi sağlandı. Fmoc Lys-HSA ve Fmoc Lys-IgG NM'lerin muameleden önceki ve sonraki protein konsantrasyonları 280 nm'de, Fmoc Lys-DNA NM'lerin muameleden

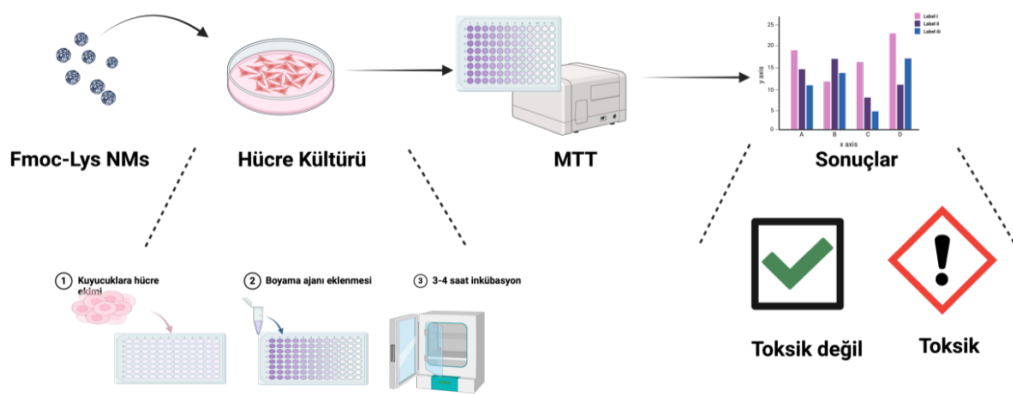
önceki ve sonraki protein konsantrasyonları da 260 nm’de (Shimadzu, Tokyo, Japonya, Model 1601) bir spektrofotometre yardımı ile okundu ve deney sonuçları kaydedildi. Fmoc-Lys-Ca⁺² NM’ler için de korona çalışmaları aynı şartlarda yapıldı ve sonuçlar kaydedildi.

3.6 MTT Deneyleri Kullanılarak Tümör Hücrelerine Karşı Fmoc-Lys NM’lerin Sitotoksitesinin Analizi

MTT, hücre canlılığının, çoğalmasının ve sitotoksitesinin bir göstergesi olarak hücrenin metabolik aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan bir tekniktir. Buradaki kolorimetrik çalışma, aktif 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) molekülünün (sarı tetrazolyum tuzu olarak da bilinir) metabolik açıdan aktif hücrelerce mor formazan kristallerine indirgenmesinin bir sonucudur (Vistica vd., 1991). Canlı hücreler, MTT yapısını formazan yapısına indirgeyebilecek NAD(P)H’ye bağlı oksidoredüktaz enzimlerini içermektedir (Berridge ve Tan, 1993).

Çözünmemiş haldeki formazan kristali yapıları bir çözücü yardımı ile çözüldükten sonra oluşan renkli çözelti, çok kuyucuklu bir spektrofotometre ile absorbans değerleri (540-720 nm) alınarak kaydedilir.

MTT reaktifi belirlenen konsantrasyonda (0,5 mg/mL (25 mg/50 mL)) hazır hale getirilir. Hücre canlılığı, MTT reaktifi kullanılarak Şekil 3.3’teki gibi analiz edilir.



Şekil 3.3. Hücre canlılığının MTT reaktifi kullanılarak analizi.

Çalışmalarımız, sentezlenen yalın Fmoc-Lys NM’ler ve Fmoc-Lys-Ca²⁺ NM’lerin insan servikal adenokarsinom hücreleri (HeLa) ve insan kolon adenokarsinoma

hücreleri (HT-29) üzerinde toksik olup olmadığı sorusuna açıklık getirmek için yapılmıştır. Fmoc-Lys NM ve Fmoc-Lys-Ca²⁺ NM'lerin HeLa ve HT29 hücre hatlarında sitotoksik etkilerinin bulunması için hücreler 1x10⁴ hücre/kuyu konsantrasyonda bulunan 96 kuyulu mikrotiplara konuldu. Başlangıçta her bir kuyucuk için DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium) ortamında hazırlanan hücre çözeltisi (100 µL) eklendi. İnkübatörde bekleme işleminden (24 saat) sonra farklı derişimlerde hazır hale getirilmiş olan NM'ler son derişimler 45,5 µg/mL ve 72.0 µg/mL olacak halde ortama eklenmiştir. Hücre ve Fmoc-Lys NM'ler birlikte 24 ve 72 saat inkübasyon işleminden sonra ölçümleri alınıp kaydedilmiştir.

3.7 siRNA'nın Fmoc-Lys, Fmoc-Lys-Ca²⁺ Nanomateryalleri ile Komplekslerinin Zeta Potansiyel Ölçümleri

Analizler, 30 mM HEPES-KOH, 100 mM potasyum asetat, 2 mM magnezyum asetat tampon çözeltisi (25 °C'de, pH 7.4) kullanılarak yapıldı. Tampon çözeltisi 0,22 µm filtre yardımı ile filtrasyon işlemine tabi tutuldu. siRNA-nanoparçacık kompleksleri, 0.5 µM siRNA konsantrasyonunda hazır hale getirildi.

Ölçümler Malvern Zeta-Sizer Nano S90 (Malvern Instruments, İngiltere) cihazı yardımı ile gerçekleştirildi. Zeta-potansiyel ölçümleri 3 tekrarlı olacak şekilde yapıldı. Sonrasında, ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanıp elde edilen sonuçlar yorumlandı.

3.8 Agaroz Jel Elektroferez

Fmoc-Lys ve Fmoc-Lys-Ca²⁺ nanomateryallerin genetik materyali (siRNA) bağlama kapasiteleri/yetenekleri, yatay agaroz jel elektrofrez yardımı ile araştırıldı. siRNA'lar (Bcl-2 ve Mcl-1) birden fazla konsantrasyonda Fmoc-Lys NM'ler ile siRNA tamponunda 30 dakika ve 24 saat boyunca inkübe edildi (1X siRNA tamponu, pH 7,5, nihai konsantrasyon 2 µM). siRNA stok çözeltileri ve Fmoc-Lys ve Fmoc-Lys-Ca²⁺ NM örnekleri, RNAaz ve DNAaz bulunmayan sulu ortamda 1X siRNA tamponunda hazırlanmıştır.

İnkübasyonun ardından, %3'lük agaroz jelin üzerine, örnekler (20.0 µL) ve 4.0 µL %40 süroz yüklenmiştir. Sürozun ortamdaki varlığı, numunelerin kuyunun

altında katmanlaşmasını sağlar. Elektroforez işlemi, Tris-Asetat-EDTA (1X TAE, pH 7,8, 40 V'de) solüsyonunda 50 dakikada gerçekleştirilmiştir.

Elektroforez esnasında siRNA göçünün görsel olarak takip edilebilmesi için RNA işaretleyici olarak 6x DNA yükleme boyası kullanılmıştır.

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jelin boyanması için, 0,5 µg/mL derişimdeki etidyum bromür (EtBr) çözeltisi içinde 30 dk inkübe edilmiştir. siRNA bantlarının tespiti için VersaDoc (jel belgeleme ve görüntüleme sistemi) üzerindeki Quantity One adlı bir analiz programından yararlanılmıştır. 30 dak boyunca Fmoc-Lys ve Fmoc-Lys-Ca²⁺ NM'lerle inkübe edilen siRNA örneklerinin elde edilen elektroforegramları kaydedildi.

3.9 Akış Sitometrisi ile NM-siRNA'nın HT-29 ve HeLa Kanser Hücrelerine Alınması

Akış sitometrisi (Flow cytometry), bir popülasyondaki tek hücreleri analiz etmeye olanak tanır. (McKinnon, 2018). siRNA'nın Fmoc-Lys NM'lerin yardımıyla tümör hücrelerine alımının gerçekleşip gerçekleşmediği sorusunu cevaplamak için 24 saat inkübasyondan sonra HeLa ve HT-29 hücrelerinin sitoflorimetrik bir analizi gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla; 2,875–72,7 µg/mL konsantrasyon aralığında ntRNA siRNA, Fmoc-Lys ve Fmoc-Lys-Ca²⁺ NM'ler ile 24 saat boyunca inkübe edildi. Hücreler, mL başına 200.000 hücre olacak şekilde komplekslerle muameleden 24 saat önce 24 kuyulu plaka üzerine ekilmiştir. Pozitif kontrol olarak ntRNA ve nanomateryaller içeren kompleksler kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak da kompleksler yerine PBS ile etkileştirilmiş hücreler kullanılmıştır. Komplekslerden floresan işaretli ntRNA negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

Hücreler kuyulara ekildikten ve 24 saat inkübasyonundan sonra kompleksler kuyulara eklendi. NM-siRNA kompleksinin stok çözeltisi pH 7,4; 0,15 M PBS içinde sentezlendi (siRNA'nın son derişimi, 100 nM). siRNA ve nanomateryaller 30 dak inkübasyona bırakıldı ve her bir kuyucuğa bu stok çözeltiden 50 µL ilave edildi.

NM-siRNA kompleksleri ile 24 saatlik inkübasyonun ardından, yapışkan hücreler yüzeyden ayrıldı ve ortamı ve konsantreyi yıkamak için 300 G kuvveti ile (yaklaşık 1700 rpm) iki kez santrifüjlendi. Son olarak numuneler küçük hacimde PBS (200 µL) içinde yeniden süspanse edildi. Floresans, 488 nm dalga boyuna sahip mavi lazer kullanılarak akış sitometresi BD FACSCanto II (Becton Dickinson, San Jose, CA, ABD) üzerinde ölçüldü. Elde edilen sonuçlar değerlendirildi.

3.10 Tümör Hücrelerine Karşı Fmoc-Lys NM ile siRNA Komplekslerin Sitotoksitesinin Analizi

Bu bölümde; Fmoc-Lys ve Fmoc-Lys-Ca²⁺ NM'lerin siRNA komplekslerinin HT-29 ve HeLa hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri incelendi. Nanomateryallerin siRNA ile inkübasyonunun (inkübasyon süresi 25 °C, 30 dak) ardından, hücre kültürü ortamı DMEM, Fmoc-Lys NM'lerin siRNA (Mcl-1 ve Bcl-xL) kompleksleri ile 24 saat etkileşiminden sonra HT-29 hücre canlılığı sonuçları kaydedildi.

Tümör hücre dizileri üzerinde siRNA ile kompleksler halindeki NM'lerin sitotoksik etkisinin analizinin sonuçları kaydedildi.

Bundan sonraki çalışmalar, tez kapsamında olan ancak aynı zamanda “Kişiye Özgü Kanser Tedavileri için Dolaşımdaki Tümör Hücrelerini ve Eksozomları Hedeflemek Üzere Dipeptit Bazlı Nanopartiküllerin Geliştirilmesi” başlıklı 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı ile yapılan çalışmaları kapsamaktadır.

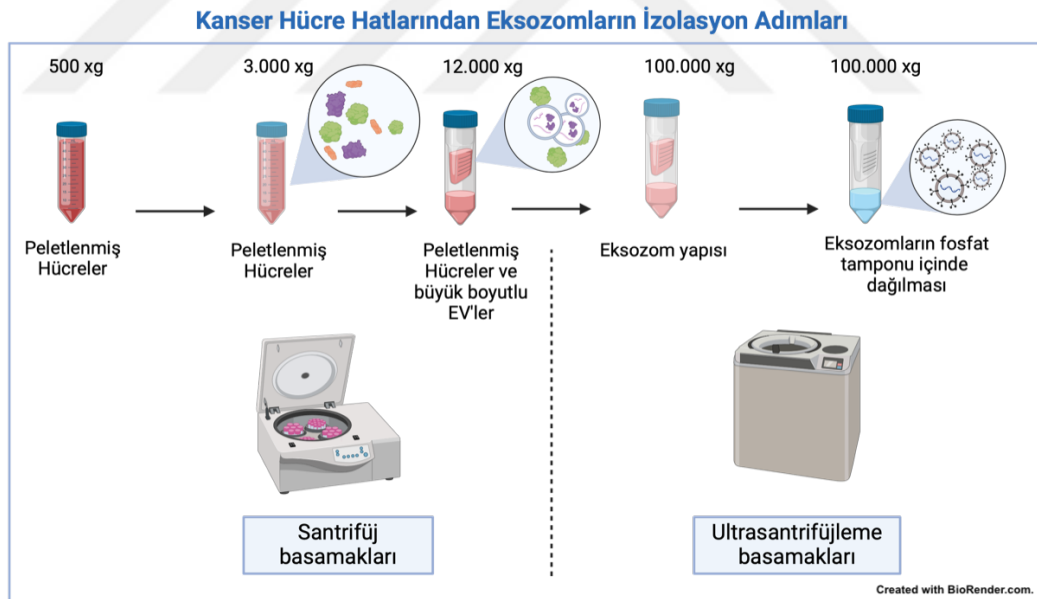
3.11 Eksozom Çalışmaları için Kullanılan Hücre Kültürü

Eksozom izolasyonu için HEK293T'yi aşırı eksprese eden CD63-GFP ve yerleşik baş ve boyun kanseri FaDu hücre dizisi kullanıldı. FaDu hücre dizisi hipofaringeal skuamöz hücreli karsinomdan oluşturulmuştur (Rangan, 1972). Çözdürülmüş hücreler görsel olarak düzenli şekilde izlendi ve tüm deneyler için maksimum 20 kez kullanıldı. Hücre hattı kimlik doğrulaması, kısa tandem tekrar (Short tandem repeat, STR) profili oluşturma yoluyla makul aralıklarla doğrulandı. FaDu hücreleri, DMEM ortamında kültürlendi ve bu ortama fetal sığır serumu (FBS, %10) ve %1 penisilin-streptomisin eklendi. HEK293T-CD63-GFP hücreleri, pozitif klonların (2 µg/mL) seçimi için DMEM ortamı, fetal sığır serumu (FBS, %10), %1 penisilin-streptomisin ve puromisin

içerisinde yetiştirildi. Hücreler 37 °C'de %5 CO₂ atmosferi altında kültürlendi ve her 3 günde bir kültür ortamı yenilendi (Siemer vd., 2021).

3.12 Diferansiyel Ultrasantrifüjleme ile Eksozom İzolasyonu

Eksozomların izolasyonu diferansiyel santrifüjleme ile gerçekleştirildi (Lobb vd., 2015). Toplanan süpernatant hücre kültürü ortamındaki hücreleri çıkarmak için 4 °C'de, 10 dak, 500xg'de ultrasantrifüj (Beckman Coulter, Avanti JXN-30 Centrifuge, ABD) kullanılarak santrifüjleme yapıldı. Daha sonra süpernatant toplandı ve kirlenici apoptotik cisimleri, mikropartikülleri ve hücre kalıntılarını çıkarmak için 0,22 mm filtrelerden (Merck Millipore) filtrelendi. Akış ortamı, eksozomları toplamak için JS24.38 salınlımlı rotor ile 90 dak boyunca 100.000xg, 4 °C'de ultrasantrifüjlendi. Süpernatant dikkatlice çıkarıldı ve ham eksozomları içeren pelletler yeniden süspanse edildi ve 1 mL soğuk PBS içerisinde toplandı. İkinci bir ultrasantrifüjleme turu (100.000xg, 4 °C, 90 dak) gerçekleştirildi ve elde edilen eksozomlar Şekil 3.4'teki gibi 500 µL PBS içerisinde yeniden süspanse edildi.



Şekil 3.4. Kanser hücre hattından eksozom izolasyonu.

3.13 Eksozomlar ve Fmoc-Lys NM'lerin Etkileşim Çalışmaları

Hücre dışı veziküllerin (Ekstrasellüler vezikül, EV) yüzey potansiyelini ve kolloidal stabilitesini değerlendirmek için Zeta potansiyelinin (ZP) ölçümünden yararlanılır. ZP, yüzey yükünün bir göstergesidir. Yüzey kimyası, biyokonjugasyon ve kullanılan

teorik model gibi çeşitli faktörlerden etkilenir. Bu EV'ler, fizyolojik koşullarda net bir negatif yüzey yüküne sahiptirler (Midekessa vd., 2020). Zetasizer Nano ZS cihazı (Malvern Instruments, Malvern, İngiltere), DLS analizi yoluyla numunelerin ortalama çapını ve yüzey yükünü analiz etmek için kullanıldı. Etkileşim çalışmalarının en önemli adımlarından biri optimal etkileşim oranlarının belirlenmesidir. Zetasizer Nano ZS cihazı (Malvern Instruments, Malvern, İngiltere), DLS analizi yoluyla numunelerin ortalama çapını ve yüzey yükünü analiz etmek için kullanıldı.

Bu amaçla, önceden Fmoc-Lys NM'ler ve eksozom oranları belirlenerek PBS içerisinde farklı pH aralıklarında 3 saat süreyle muamele edildi. Daha sonra Fmoc-Lys NM ve eksozom ikilisinin boyut ve zeta potansiyeli ölçüldü ve maksimum etkileşim oranı belirlendi.

Nanomateriyallerin biyolojik sıvılardaki optimum etkileşimlerini incelemek için önemli parametreler olan pH ve NM konsantrasyonu çalışmaları ile deneylere devam edildi. Tüm etkileşim deneyleri için bir döndürücü sistem (rotatör) (Stuart® SB3) kullanıldı.

Bu amaçla Fmoc-Lys NM'ler (0,5 ve 1 mg/mL), silisyum nanopartiküller (SiNP) (25 ve 60 µg/mL) ve izole edilmiş eksozomlar (0,2 µg/mL) fizyolojik pH aralığında inkübe edildi (pH 6,5; 7,0; 7,4). Tüm etkileşimler, 3 saat boyunca 10 rpm'de hafif rotasyonla PBS tamponunda gerçekleştirildi. Etkileşimden sonra ilgili NM'lerin ve eksozomların zeta potansiyeli ve zeta boyutu ölçüldü.

3.14 Kolloidal Stabilite Çalışmaları

Nanomateriyallerin koloidal stabilitesinin niceliği, yalnızca basit elektrolitler içeren sulu çözeltilerde etkili bir şekilde ölçülebilir (Moore vd., 2015). Bu amaçla, HNC (Head and Neck Cancer (baş ve boyun kanseri)) bazlı eksozomlar, Fmoc-Lys NM' ve SiNP' yapıları ile PBS tamponunda (4 °C, pH 6,5: 72 saat) etkileşime bırakılarak, yapıların stabilitesi ve son yükleri ile boyutları test edildi. 72 saatin sonunda ZP ve ZS değerleri ölçüldü ve sonuçlar kaydedildi.

3.15 Hücre Canlılığı  alışmaları

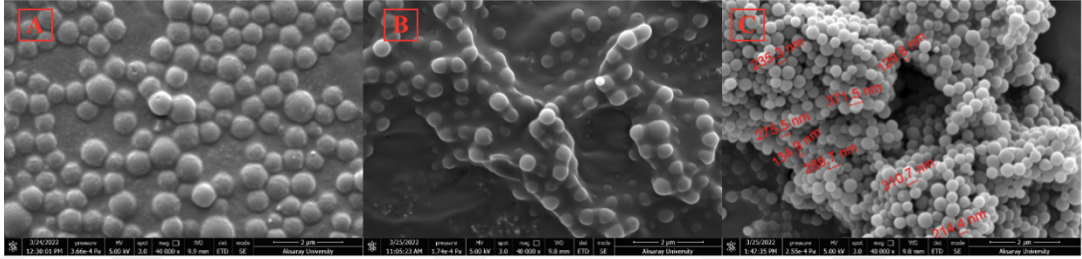
Hücre canlılığını araştırmak için hücreler 96 oyuklu plakalara (5000 hücre/oyuk) ekildi ve ekildikten 24 saat sonra belirtilen konsantrasyonlarda ($n = 3$ kez tekrarlı olacak şekilde) iyileştirme (tedavi) işlemi yapıldı. İyileştirme işleminden 4, 24 ve 48 saat sonra, üreticinin talimatlarına göre Tecan Spark[ ] (Tecan Group Ltd., M nnedorf, İsviçre) cihazı kullanılarak lüminesans sinyaller kaydedildi. Sinyaller, iyileştirilmemiş kontrol örneklerine normalleştirildi.

İyileştirme aşamasından sonra Alamar Blue   zeltisi ile hücre canlılığı ölçümleri yapıldı. Ortam %10 Alamar Blue içeren taze ortamla değiştirildi ve 1-2 saat inkübe edildi. Resorufinin floresansı bir Tecan Spark'ta 550 nm eksitasyon ve 595 nm emisyon dalga boylarında tespit edildi. Alamar Blue içeren ancak hücre içermeyen ortamın değerleri çıkarıldı ve canlılık, aynı koşullar altında inkübe edilen kontrol numunelerine göre normalleştirildi.

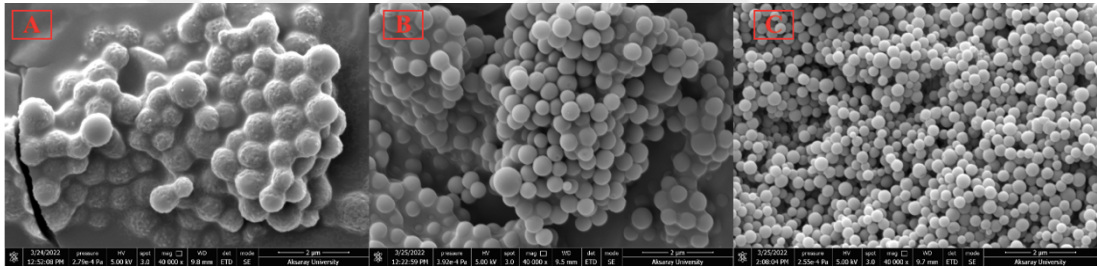
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 Peptit Temelli Nanomateriyallerin Sentezi ve Karakterizasyonu

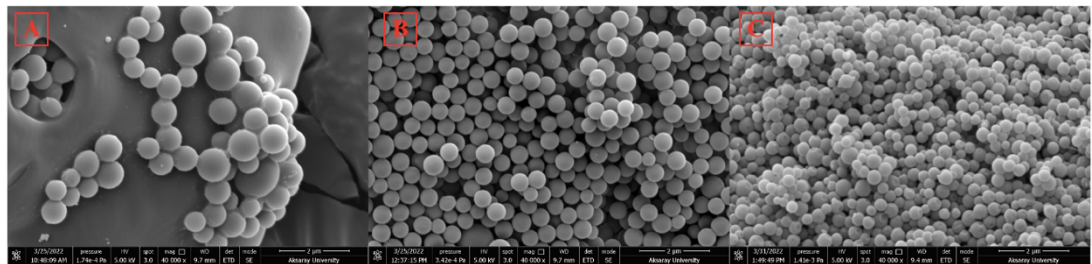
Çizelge 3.1’de verilen çapraz bağlama süreleri ve GA oranları dikkate alınarak sentezlenen Fmoc-Lys NM’lerin SEM görüntüleri Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3’te verilmiştir.



Şekil 4.1. Farklı GA oranlarında ve 2 saatlik çapraz bağlanma süresi ile sentezlenen Fmoc-Lys NM’lerin SEM görüntüleri (A: 0,3 mL GA, B: 0,6 mL GA, C: 0,9 mL GA).



Şekil 4.2. Farklı GA oranlarında ve 4 saatlik çapraz bağlanma süresi ile sentezlenen Fmoc-Lys NM’lerin SEM görüntüleri (A: 0,3 mL GA, B: 0,6 mL GA, C: 0,9 mL GA).

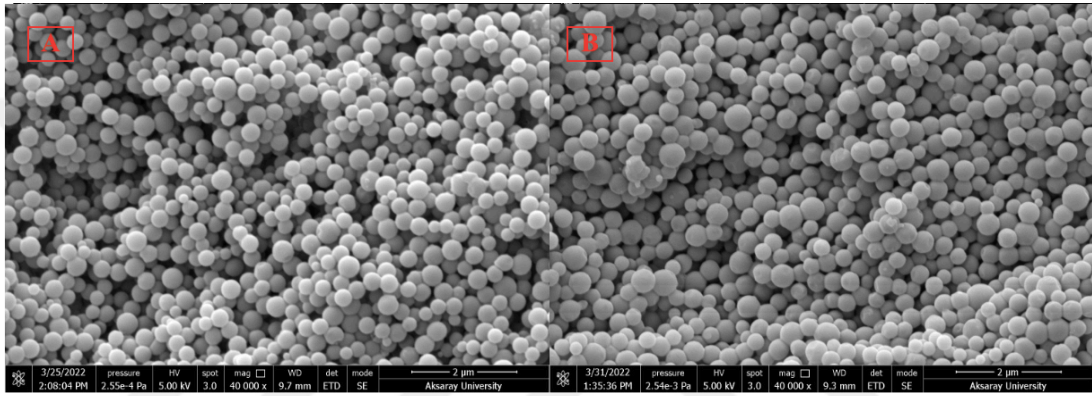


Şekil 4.3. Farklı GA oranlarında ve 6 saatlik çapraz bağlanma süresi ile sentezlenen Fmoc-Lys NM’lerin SEM görüntüleri (A: 0,3 mL GA, B: 0,6 mL GA, C: 0,9 mL GA).

Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3’teki SEM görüntülerinden görüldüğü gibi hem artan GA miktarı hem de artan çapraz bağlanma süresi boyunca Fmoc-Lys NM’lerin oluştuğu gözlemlendi. Ancak optimal ve eş boyutluluk parametrelerine minimum

zamanda ulaşım açısından bundan sonraki çalışmalar için 0,9 mL GA varlığında 4 saatlik çapraz bağlanma süresi tercih edildi.

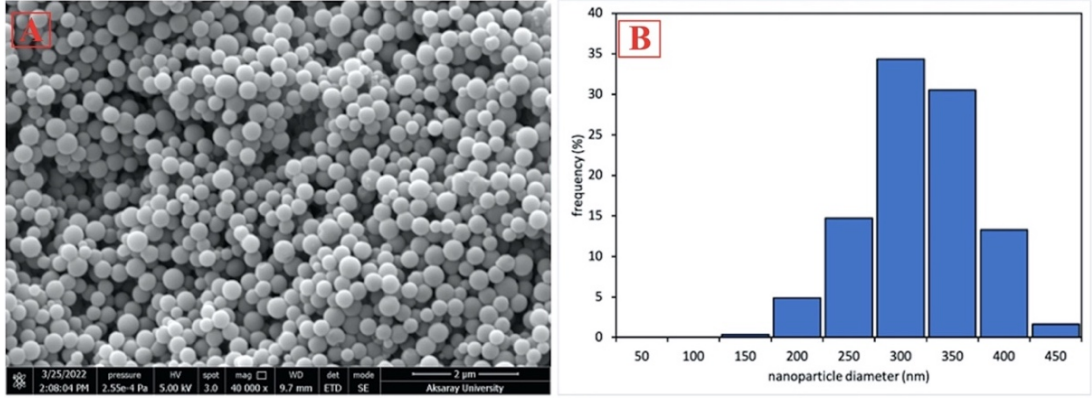
Yapılan denemeler sonucu elde edilen ideal boyutlara ulaştıktan sonra sonikasyonlu ortamın, elde edilen nanomateryallerin boyutlarına etkisini incelemek için 0,9 mL GA varlığında 4 saatlik çapraz bağlanma süresi boyunca her 30 dakika sonunda 5 dakika süresince ilgili vial sonike edildi. Çapraz bağlanma süresi sonunda yine kendiliğinden düzenlenme işlemi için bir gece karanlıkta bekletildi. Elde edilen aynı şartlardaki sonikasyonlu ve sonikasyonsuz SEM görüntüleri Şekil 4.4'te verildi.



Şekil 4.4. 0,9 ml GA varlığında ve 4 saatlik çapraz bağlanma süresinde sentezlenen Fmoc-Lys NM'lerin SEM görüntüleri (sonikasyonsuz (A); sonikasyonlu (B)).

Şekil 4.4'teki SEM görüntülerinden de görüleceği üzere 0,9 mL çapraz bağlayıcı miktarı uygulanarak, 4 saatlik çapraz bağlanma süresi boyunca ultrasonikasyon uygulanmadan (Şekil 4.4A) ve uygulanarak (Şekil 4.4B) sentezlenen Fmoc-Lys NM'lerin yapılarında herhangi bir fark gözlenmemiştir. Sonraki çalışmalara 0,9 mL GA varlığı ve 4 saatlik çapraz bağlanma süresi göz önünde bulundurularak sonikasyonsuz ortam ile devam edilmiştir.

Şekilde 4.5A'da Fmoc-Lys NM'lerin seçilen ideal şartlarda alınan SEM görüntüleri verilmiştir. Buradaki verileri kullanarak ImageJ programıyla yapılmış olan boy dağılımı analizi grafiği ise Şekil 4.5B'de görülmektedir.

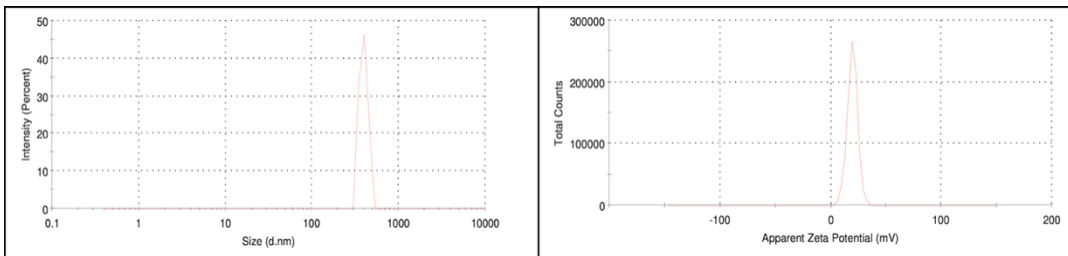


Şekil 4.5. 0,9 ml GA varlığında ve 4 saatlik çapraz bağlanma süresinde sentezlenen Fmoc-Lys NM'lerin SEM görüntüleri (A); ImageJ ile yapılan boy dağılım analizi (B).

Bu sonuçlara göre, Fmoc-Lys NM'lerin ortalama olarak çapı $293,35 \pm 55,65$ nm'dir (ort. $\pm$ st sap., n=550). Bu verilerden yola çıkarak nano-yapıların polidispersite endeksi eşitlik 4.1 kullanılarak hesaplanmıştır (Raval vd., 2019). Fmoc-Lys NM'lerin polidispersite endeksi 0,0358 olarak bulunmuştur ve bu sonuç nanoyapıların monodispers olduğunu göstermektedir.

$$PDI = (Standart Sapma/Ortalama)^2 \quad (4.1)$$

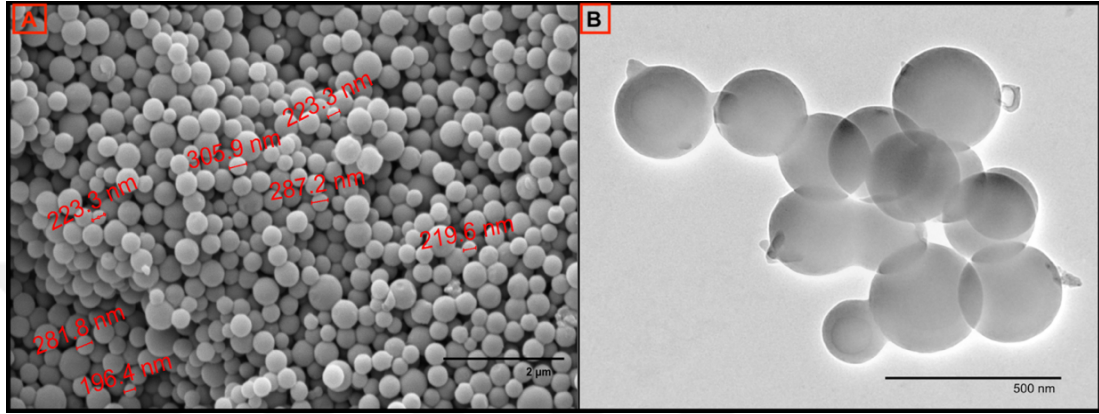
Fmoc-Lys NM'lerin DLS (dinamik ışık saçılması) analizleri de gerçekleştirilmiştir. Deney sonuçları sulu ortamda 25 °C'de kaydedilmiştir (dielektrik sabiti: 78,5, viskozite: 0,8872 cP, geri saçılma açısı: 173°, refraktif indeks (RI): 1,33). 1 mg/mL konsantrasyondaki nanomateryal solüsyonunun elektroforetik mobilitesi ölçüldükten sonra veriler, Helmholtz-Smoluchowski eşitliğinden yararlanarak ζ -potansiyel ve boyut sonuçlarına dönüştürülmüştür. Analiz sonuçları Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Fmoc-Lys NM'lerin DLS analizleri.

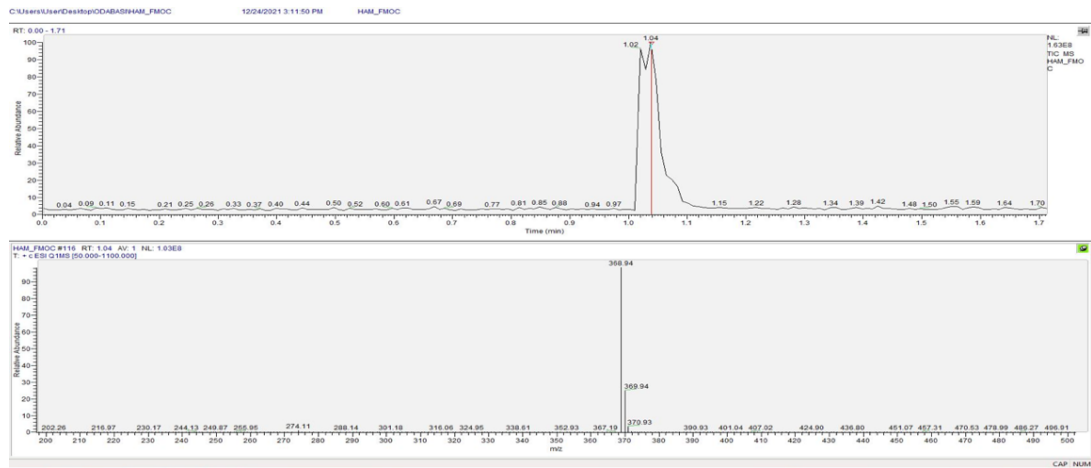
Dinamik ışık saçılma grafiklerinden alınan boyut sonuçları SEM ve ImageJ programından elde edilen sonuçlar ile eşleşirken, Fmoc-Lys NM'lerin zeta potansiyelleri de +19,4 mV olarak ölçülmüştür.

Fmoc-Lys NM'lerin TEM analizleri incelendiğinde (Şekil 4.7B), SEM görüntülerinin (Şekil 4.7A) ve boyut analizlerinin örtüştüğü görülmektedir.

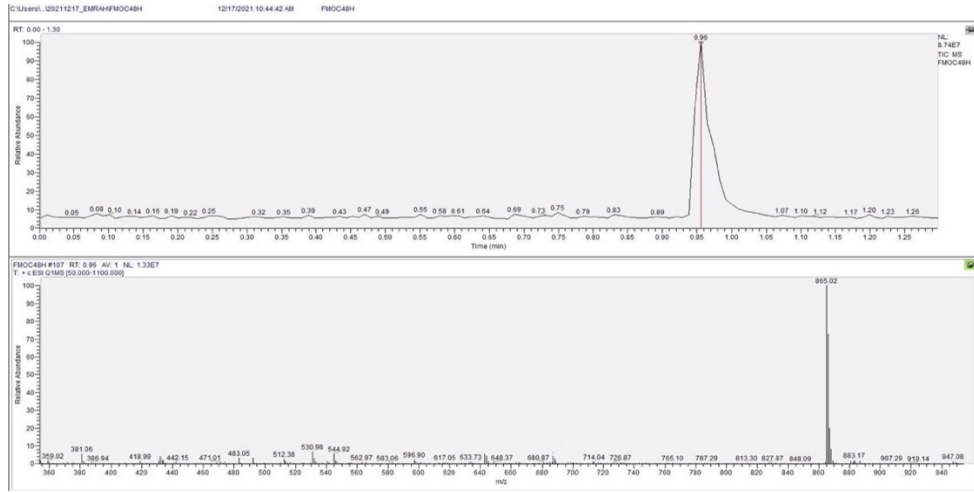


Şekil 4.7. Fmoc-Lys NM'lerin SEM (A) ve TEM (B) görüntüleri.

Sentezlenen Fmoc-Lys NM'lerin kütle analizleri LC-MS/MS sistemi ile analiz edilmiştir. Monomer Fmoc-Lys molekülünün ve sentezlenen Fmoc-Lys NM'lerin kütle sonuçları Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da gösterilmiştir.



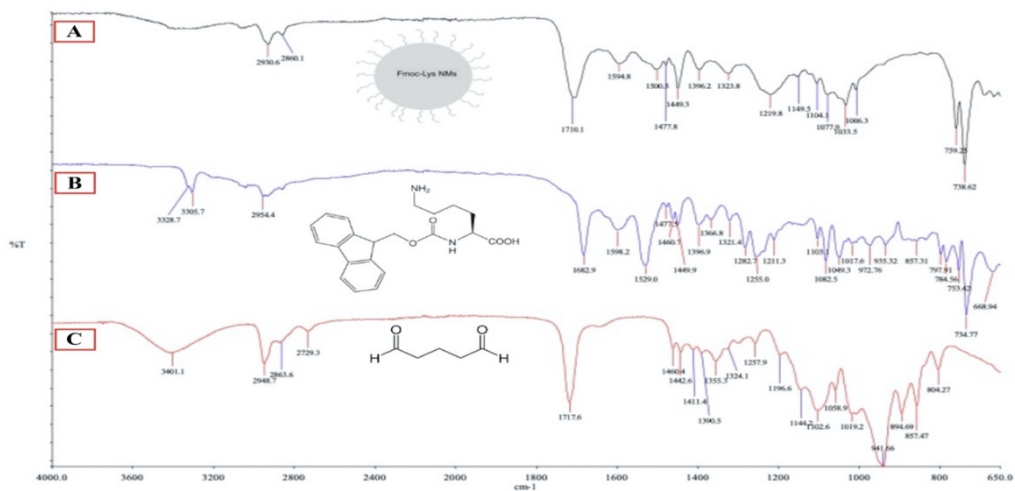
Şekil 4.8. Monomer Fmoc-Lys molekülünün kütle spektroskopisi analizi (Fmoc-Lys = 368,94 g/mol).



Şekil 4.9. Fmoc-Lys NM'nin 4 saat GA ile muamele edilip sulu ortamda kendi kendine düzenlenme sonrası alınan kütle spektroskopisi analizi (Fmoc-Lys = 865,02 g/mol).

Fmoc-Lys NM'lerin için LC-MS/MS analizi sonucu elde edilen bulgular incelendiğinde (Şekil 4.9) monomer Fmoc-Lys moleküllerinin GA ile 4 saatlik etkileşimlerinin sonunda Fmoc-Lys NM'lerin oluştuğu görülmektedir. Ayrıca, etkileşime girmemiş Fmoc-Lys monomerlerin (Şekil 4.8) ortamda varlığına rastlanmadığı görülmektedir. Bu durum, Fmoc-Lys NM'lerin 4 saatlik süre sonunda yüksek verimde elde edildiğini göstermektedir.

Fmoc-Lys NM'lerin sentezini fonksiyonel gruplar üzerinden göstermek için ATR-FTIR analizleri yapılmış ve analiz sonuçları Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Fmoc-Lys NM (A), monomer Fmoc-Lys (B) ve GA'nın (C) ATR-FTIR spektrumları.

Şekil 4.10'da Fmoc-Lys monomerinin (B) FTIR spektrumunda görüldüğü gibi 1682 cm^{-1} deki absorpsiyon piki amid grubunun C=O gerilmesi, 1529 cm^{-1} 'deki absorpsiyon piki primer amin grubunun N-H bükülmesi ve 1598 cm^{-1} 'deki absorpsiyon piki primer amin grubunun NH_2 bükülmesi sonuçlarıdır.

GA'nın FTIR spektrumunda (C) 1717 cm^{-1} 'deki absorpsiyon piki de GA'nın aldehit gruplarına ait C=O gerilmesini göstermektedir.

Fmoc-Lys NM'lerine ait FTIR spektrumu incelendiğinde (A) 1598 cm^{-1} 'deki pikin şiddetinin azalarak 1594 cm^{-1} 'de yer aldığı dikkat çekmektedir. 1529 cm^{-1} 'deki N-H bükülmesine ait pik, GA ile çapraz bağlanma sonucu tamamen ortadan kalkmıştır. Ayrıca, 1710 cm^{-1} 'deki absorpsiyon piki amin ile konjuge olmuş aldehit grubunun varlığına (C=N gerilmesi, Schiff bazı) işaret etmektedir.

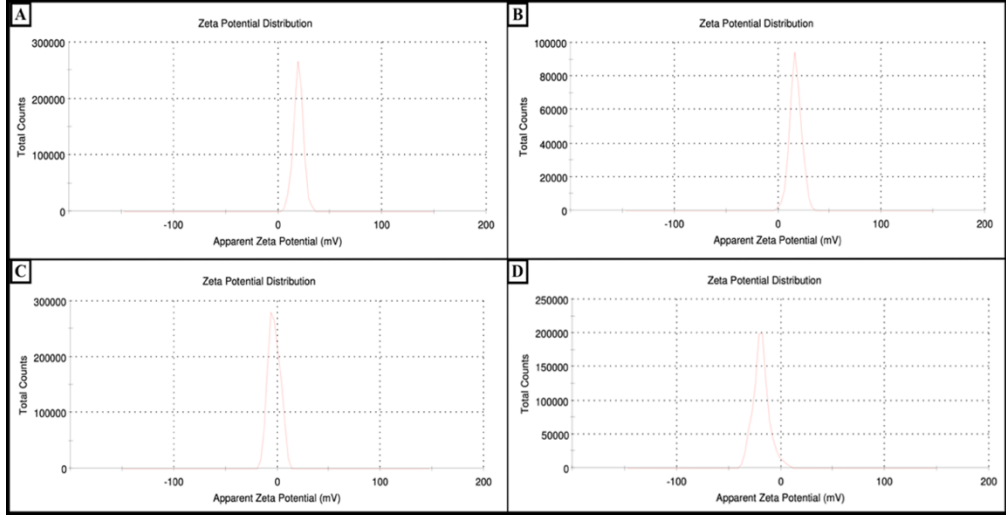
Bu sonuçlar, Fmoc-Lys NM'lerin amin grupları ile GA'nın aldehit gruplarının varsayıldığı gibi çapraz bağlandıklarını göstermektedir. Fmoc-Lys NM'lerin FTIR spektrumunda 2930 ve 2860 cm^{-1} 'deki absorpsiyon pikleri sırayla GA'nın asimetrik C-H ve simetrik C-H gerilme pikleridir. Buradaki sonuçlar da çapraz bağlanmanın olduğunu kanıtlamaktadır.

4.2 Fmoc-Lys NM'lere Ca^{2+} İyonlarının Bağlanması

Yalın Fmoc-Lys NM'lerin yüzey yükleri +19,4 mV olarak ölçülmüştür ve bu değer hücre etkileşim çalışmaları için ideal bir yük olmasına rağmen Ca^{2+} iyonları ile dekorasyonun hücre etkileşimindeki etkisini de görmek için Fmoc-Lys NM'ler, saf suda hazırlanan 10, 50 ve 100 ppm olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ çözeltileriyle etkileştirilmiştir. Deney sonuçları kaydedilmiş ve Zeta potansiyel değerleri (mV) Çizelge 4.1 ve Şekil 4.11'de gösterilmiştir. Ayrıca, Fmoc-Lys NM'lerin Ca^{2+} iyonları ile oluşturdukları olası bir etkileşim modeli de Şekil 4.12'de verilmiştir.

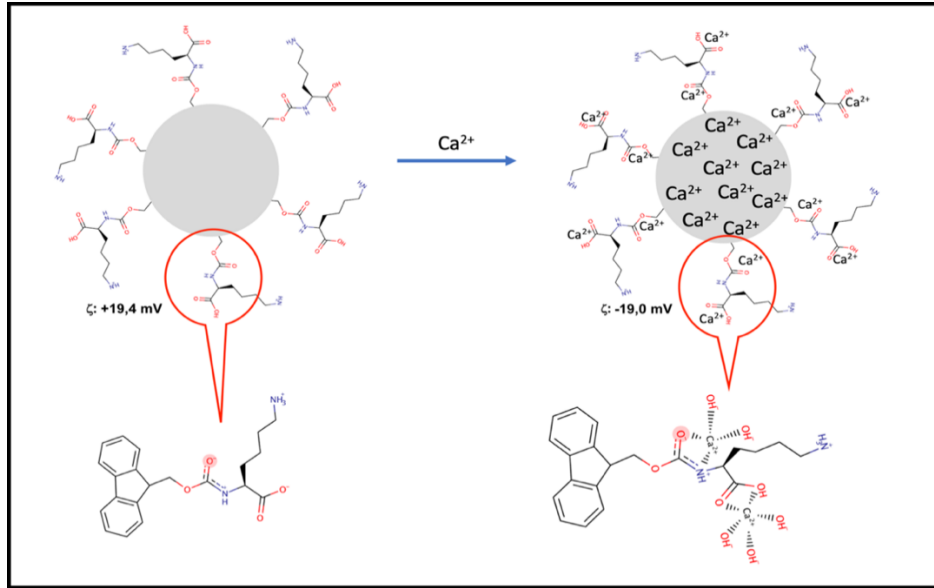
Çizelge 4.1. Farklı konsantrasyonlarda Ca^{2+} iyonları ile etkileştirilmiş Fmoc-Lys NM'lerin Zeta potansiyel değerleri.

	Fmoc-Lys	Fmoc-Lys- Ca^{2+}	Fmoc-Lys- Ca^{2+}	Fmoc-Lys- Ca^{2+}
Zeta(mV)	+19,4	+15,5	-3,0	-19,0



Şekil 4.11. Fmoc-Lys NM'lerin çeşitli $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ konsantrasyonlarda alınmış Zeta potansiyelleri: (A) Yalın Fmoc-Lys, ζ : +19,4 mV; (B) 10 ppm- Ca^{2+} - Fmoc-Lys, ζ : +15,5 mV; (C) 50 ppm- Ca^{2+} - Fmoc-Lys, ζ : -3,0 mV; (D) 100 ppm- Ca^{2+} - Fmoc-Lys, ζ : -19,0 mV.

Şekil 4.11'de görüldüğü üzere, yalın Fmoc-Lys NM'lerin yüzey yükleri +19,4 mV iken, Ca^{2+} iyonları ile etkileşim sonrası artan derişimlere paralel olarak yüzey yük potansiyelleri pozitif yükten eksi yüke doğru (ζ : -19,0 mV) kaymıştır. Ca^{2+} iyonlarının NM yüzey yükünde pozitif yönden eksi yöne kayma oluşturmaları normalde beklenen bir durum değildir. Fmoc-Lys NM'ler ve Ca^{2+} iyonları arasındaki olası etkileşim modeli Şekil 4.12'deki gibidir.



Şekil 4.12. Fmoc-Lys NM'ler ve Ca^{2+} iyonları arasındaki olası etkileşim modeli.

NM yüzey yükündeki eksi yönde oluşan kayma Şekil 4.12’de gösterilen Fmoc-Lys molekülündeki elektronların delokalizasyonu, delokalize bağların Ca^{2+} iyonları ile etkileşimi, Ca^{2+} iyonlarının 8 moleküle kadar su bağlama özelliği (Katz vd., 1996) ve ortam pH’sına bağlı olarak bu su moleküllerinin deproton olmaları (Jerker, 1990) durumları ile açıklanabilir. Bu bölümde elde edilen yalın Fmoc-Lys NM’ler (ζ : +19,4 mV) ile 10 ppm Ca^{2+} iyonları ile dekore edilmiş Fmoc-Lys NM’ler (ζ : +15,5 mV) korona testlerinin ardından hücre çalışmaları için devam edilmiştir.

4.3 Fmoc-Lys NM’lerin HSA, IgG ve DNA Biyomolekülleri ile Etkileşimleri

Fmoc-Lys NM ve Fmoc-Lys- Ca^{2+} NM’lerin farklı biyomoleküllerle korona çalışmaları yürütülmüştür. Nanoyapıların insan serum albümini (HSA), immünoglobulin G (IgG) ve DNA biyomolekülleri ile korona oluşumları incelenmiş ve deneysel çalışmaları aşağıda verilmiştir. NM’ler üzerinde oluşan korona yapıların miktarları HSA, IgG ve DNA için Çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Fmoc-Lys NM’ler ve HSA, IgG ve DNA molekülleri ile etkileşimleri.

C_{HSA} (mg/mL)	Fmoc-Lys-HSA (g/g)	Fmoc-Lys- HSA- Ca^{2+} (g/g)
35	23,94	18,97
C_{IgG} (mg/mL)	Fmoc-Lys-IgG (g/g)	Fmoc-Lys- IgG- Ca^{2+} (g/g)
7	15,71	16,37
C_{DNA} (mg/mL)	Fmoc-Lys-DNA (mg/g)	Fmoc-Lys- DNA- Ca^{2+} (mg/g)
0,035	5,41	7,20

Nanomateriyallerin biyolojik moleküller ile karşılaşma durumunda yüzeyinde meydana gelen oluşumlarda biyomolekülün boyutu kadar NM’nin boyutu ve üzerindeki yükü de önemli rol oynamaktadır (Mahmoudi vd., 2011). Çizelge 4.2’de yalın Fmoc-Lys ve Fmoc-Lys- Ca^{2+} NM’lerin üzerinde oluşan HSA, IgG ve DNA’nın çalışılan derişimlerdeki miktarları verilmektedir. Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi NM’ler üzerinde oluşan korona yapıların miktarları biyomolekülün değişmesiyle farklılık göstermektedir. Bu oranlar, 18,97 g/g HSA, 16,37 g/g IgG ve 7,2 mg/g DNA olarak gerçekleşmiştir. (Bu oranlar 1 gram NM’ye tutunan biyomoleküllerin miktarlarını vermektedir).

Korona yapılar oluşurken bazı önemli noktalar söz konusudur. Korona yapıyı oluşturan biyomolekülün boyutu, izoelektrik noktası (pI), derişimi, NM'nin yüzey yükü ve boyutu gibi parametreler büyük önem taşımaktadır (Kopp vd., 2017). IgG 150 kDa'luk bir moleküler ağırlığa ve 10-15 nm'lik bir boyuta sahipken (Kopp vd., 2017), HSA 66,5 kDa'lık bir moleküler ağırlığa ve 8-13 nm'lik bir boyuta sahiptir (Kiselev vd., 2001).

Yürütülen çalışmalarda, protein boyutunun büyüklüğü yüzey korona oluşumunda etkinliğini kanıtlamıştır. IgG'nin korona oluşturmada HSA'ya oranla daha düşük bağlanması IgG'nin boyut olarak büyüklüğüne bağlanabilir.

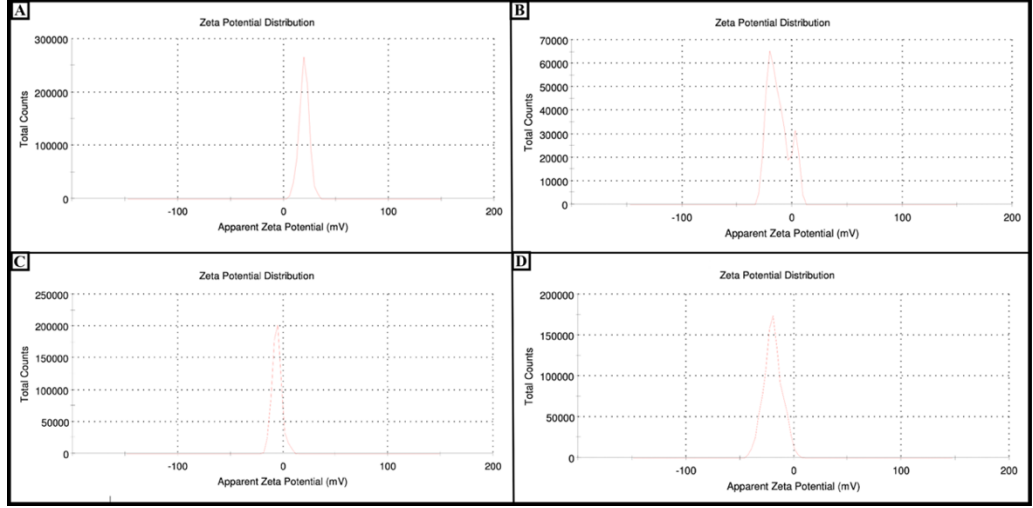
Ayrıca, yüzey yükünün negatif olmasına rağmen ortamdaki derişiminin düşük olmasından dolayı, DNA moleküllerinin pozitif yüklü NM'lere tutunması düşük bir düzeyde (mg/g) gerçekleşmiştir.

Nükleotit zincirleri çok güçlü polielektrolit zincirlerdir. DNA ve RNA gibi moleküller ortam derişimleri ne kadar düşük olursa olsun zeta değerini değıştirmede güçlü rol oynarlar. Burada zetadaki büyük değışiklik DNA'nın güçlü polielektrolit yapısından ileri gelmektedir. HSA ve IgG ise zayıf negatif proteinler oldukları ve büyük proteinler oldukları için NM ile etkileşen miktar fazla olsa, yüzey yükünü DNA kadar değıştirmesini bekleyemeyiz.

Fmoc-Lys-Ca²⁺ NM'lerin biyomoleküllerle oluşturduğu korona yapılarının Zeta potansiyel sonuçları ve grafikleri sırasıyla Çizelge 4.3 ve Şekil 4.13'te verilmektedir.

Çizelge 4.3. Fmoc-Lys-Ca²⁺ NM'lerin korona yapılarının Zeta potansiyel değıerleri.

	Fmoc-Lys-Ca²⁺	Fmoc-Lys-Ca²⁺- HSA	Fmoc-Lys-Ca²⁺-IgG	Fmoc-Lys-Ca²⁺-DNA
Zeta (mV)	+15,5	-16,4	-5,9	-19,5

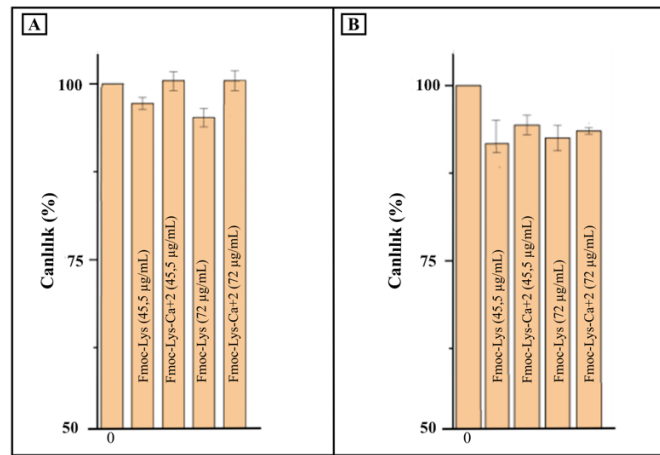


Şekil 4.13. Fmoc-Lys- Ca^{2+} NM'lerin farklı biyomoleküllerle korona yapılarının Zeta potansiyelleri: (A) 10 ppm- Ca^{2+} - Fmoc-Lys, ζ : +15,5 mV; (B) Fmoc-Lys- Ca^{2+} -HSA, ζ : -16,4 mV; (C) Fmoc-Lys- Ca^{2+} -IgG, ζ : -5,9 mV; (D) Fmoc-Lys- Ca^{2+} -DNA, ζ : -19,5 mV.

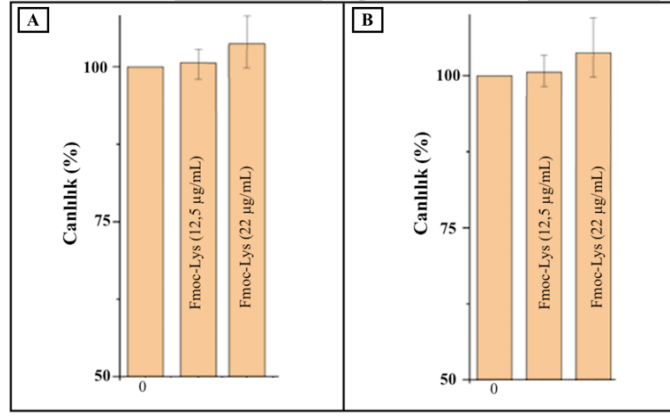
NM'lerin Zeta potansiyelleri +15,5 iken, HSA, IgG ve DNA ile etkileşen NM'lerin yüzey yükleri sırasıyla -16,4, -5,9 ve -19,5 mV değerlerini almıştır. Elde edilen sonuçlar NM'lerin fizyolojik bir ortamda korona oluşturdıklarını göstermektedir.

4.4 Fmoc-Lys NM'lerin Tümör Hücrelerine Karşı Sitotoksite Analizi

MTT deneyleri aracılığı ile Fmoc-Lys NM'lerin HeLa ve HT29 hücrelerine karşı sitotoksitesinin analizi Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'te gösterilmiştir.



Şekil 4.14. Farklı konsantrasyonlarda (45,5 ve 72,0 $\mu\text{g/mL}$) 24 (A) ve 72 (B) saat boyunca Fmoc-Lys ve Fmoc-Lys- Ca^{2+} NM'ler ile inkübasyondan sonra canlı HeLa hücrelerinin yüzdesi.



Şekil 4.15. Farklı konsantrasyonlarda (12,5 ve 22 µg/mL) 24 (A) ve 72 (B) saat boyunca Fmoc-Lys NM’ler ile inkübasyondan sonra canlı HT-29 hücrelerinin yüzdesi.

Şekil 4.14’ten görülebileceği gibi yukarıda belirtilen NM’ler ile 24 saatlik inkübasyondan sonra HeLa hücrelerinin yaşayabilirliği 72 µg/mL konsantrasyonda Fmoc-Lys NM’ler için yaklaşık olarak %8 kadar düştüğü gözlenmiştir.

Aynı zamanda, Ca^{2+} iyonları ile katyonize edilmiş Fmoc-Lys NM’ler varlığında HeLa hücrelerinin canlılığının azalmadığı görülmektedir. Hücrelerin NM’ler ile inkübasyon süresinin 72 saate kadar artması, hücre canlılığının yaklaşık olarak %10 düşmesine neden olmuştur (Şekil 4.14). Ayrıca, Fmoc-Lys- Ca^{2+} NM’ler varlığında hücre canlılığı da %7 kadar düşmektedir. HT-29 hücrelerinin Fmoc-Lys NM’lerin mevcudiyetinde yaşayabilirliğinin incelenmesi durumunda, 24 ve 72 saat sonra hücrelerin hayatta kalma oranı yaklaşık aynıdır ve toksik değildir (Şekil 4.15).

Böylece elde edilen verilere dayanarak, Fmoc-Lys NM’ler ve Fmoc-Lys- Ca^{2+} NM’lerin HeLa ve HT-29 hücre hatları için toksik olmadığı sonucuna varılabilir.

4.5 Fmoc-Lys ve Fmoc-Lys- Ca^{2+} NM’lerin siRNA Komplekslerinin Zeta Potansiyel Ölçümleri

siRNA’nın Fmoc-Lys NM ile inkübasyonunun ardından oluşan komplekslerinin zeta-potansiyel değerleri Çizelge 4.4’te verilmiştir.

Çizelge 4.4. 1X siRNA tamponundaki (pH 7,5) parçacıkların DLS parametreleri.

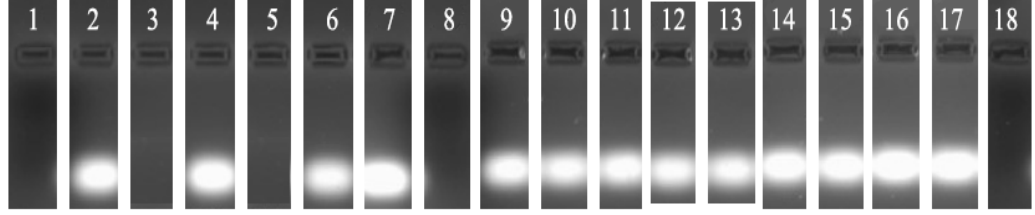
Partikül (1X siRNA tampon, pH 7.5)	ZP (mV)
siRNA-Mcl-1 (0,5 µM)	-1,15±1,71
siRNA-Bcl-2 (0,5 µM)	-0,98±0,39
siRNA-Fmoc-Lys (62,5 µg/ml)	-8,11±1,48
siRNA-Fmoc-Lys-Ca ²⁺ (62,5 µg/ml)	-7,12±3,42

Fmoc-Lys NM'lerin yüzey potansiyelleri +19.4 mV olarak ölçülmüşken siRNA'nın yüzey potansiyelinin negatif olduğu da rapor edilmiştir (Tong vd., 2018). Bu değerlere bakılarak, nanomateriyallerin siRNA ile elektrostatik etkileşimler yardımı ile kompleks oluşturduğu söylenebilir. Pozitif yüklü nanopartiküllerin tercihen tümörler tarafından alındığı (Cafaggi vd., 2007; Yang vd., 2009) ve negatif yüklü veya nötr parçacıklara kıyasla daha uzun bir süre boyunca tutulduğu literatürde verilmektedir (Cafaggi vd., 2007). Çünkü negatif yüklü bir kalıntı olan fosfatidil serin, kanser hücrelerinin yüzeyine taşınırken (Kommareddy vd., 2006), pozitif yüklü nanopartiküller, tümör hücreleri tarafından ya endositoz ile ya da yük etkileşimleri ile yer değiştirebilir (Chun vd., (2009). Nanopartiküllerin hücreler tarafından alımı iki aşamalı bir süreç olarak görülebilir: Hücre zarına bağlanma ve hücre internalizasyon şeklindedir.

Bunlardan ilki, parçacıkların fiziko-kimyasal özelliklerinden ve özellikle yüzey yükünden çok etkileniyor olmasıdır (Chun vd., 2009 ; Huynh., 2009). Pozitif yüklü nanopartiküllerin hücreler tarafından nötr veya negatif yüklü nanopartiküllere göre daha fazla internalize olduğu genel olarak kabul edilmektedir (Chun vd., 2009; Zhao vd., 2015; Verma ve Stellacci., 2010; Kralj vd., 2012; Panariti vd., 2012; Schweiger vd., 2012; He vd., 2010; Nazarenus vd., 2014; Yang vd., 2012; Yue vd., 2011). Kabul edilen bu açıklama, negatif yüklü hücre zarı ile elektrostatik etkileşimlerin tercih edildiği gerçeğinde yatmaktadır. Bu gözlem, çeşitli nanopartiküllerde, farklı hücre tiplerinde ve işlevselleştirme türlerinde gözlemlenen genel bir eğilimdir (Diepstraten vd., 2022; Weyhenmeyer., 2012; Gonsalves vd., 2018). Pozitif yüklü nanopartiküllerin genellikle ilaç veya gen aktarımı için taşıyıcı olarak seçilmesinin nedeni budur (Zhao vd., 2015; Verma ve Stellacci., 2010; Yue vd., 2011). Burada, Fmoc-Lys NM'lerin pozitif yüke sahip olması etkileşim için herhangi bir modifikasyona gerek kalmadan etkileşime girmesi önemli bir avantajdır.

4.6 siRNA'nın Fmoc-Lys, Fmoc-Lys-Ca²⁺ Nanomateryalleri İle Komplekslerinin Agaroz Jel Elektrophorez Ölçümleri

30 dakika boyunca Fmoc-Lys ve Fmoc-Lys-Ca²⁺ NM'lerle inkübe edilen siRNA örneklerinin elde edilen elektroforegramları Şekil 4.16'da ve Çizelge 4.5'te sunulmuştur.



Şekil 4.16. siRNA'nın farklı konsantrasyonlarda Fmoc-Lys ve Fmoc-Lys-Ca²⁺ nanomateryalleri ile etkileştiği elektroforegram sonuçları. (NM-siRNA etkileşim süresi 30 dak, 25 °C, 2.0 µM siRNA; 1X siRNA tampon, pH 7,5)

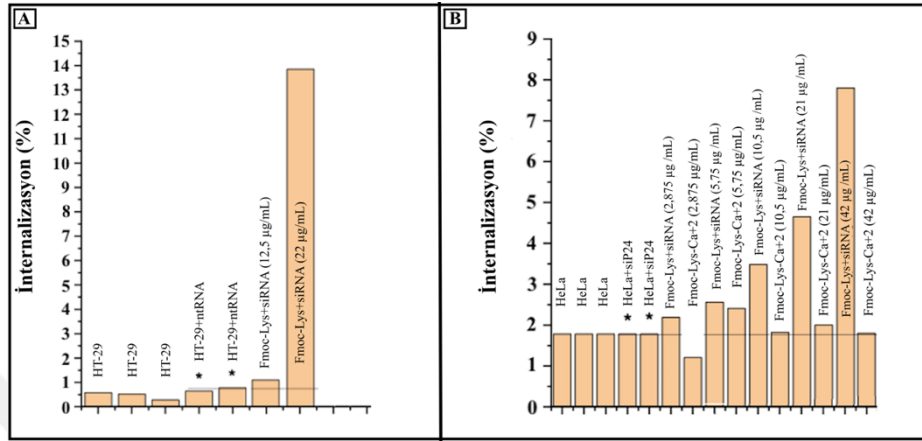
Çizelge 4.5. siRNA'nın farklı konsantrasyonlardaki Fmoc-Lys ve Fmoc-Lys-Ca²⁺ NM'ler ile etkileştiği elektroforegramın karşılığı.

1	siRNA buffer+6x DNA loading Dye	10	siMcl-1 + Fmoc-Lys (62,5 µg/mL)
2	siMcl-1	11	siMcl-1 + Fmoc-Lys -Ca ²⁺ (62,5 µg/mL)
3	Fmoc-Lys (200 µg/mL)	12	siMcl-1 + Fmoc-Lys (40 µg/mL)
4	siMcl-1 + Fmoc-Lys (200 µg/mL)	13	siMcl-1 + Fmoc-Lys -Ca ²⁺ (40 µg/mL)
5	Fmoc-Lys -Ca ²⁺ (200 µg/mL)	14	siMcl-1 + Fmoc-Lys (25 µg/mL)
6	siMcl-1 + Fmoc-Lys -Ca ²⁺ (200 µg/mL)	15	siMcl-1 + Fmoc-Lys -Ca ²⁺ (25 µg/mL)
7	siMcl-1	16	siMcl-1 + Fmoc-Lys (6,6 µg/mL)
8	siRNA buffer+6x DNA loading Dye	17	siMcl-1 + Fmoc-Lys -Ca ²⁺ (6,6 µg/mL)
9	siMcl-1	18	siRNA buffer+6x DNA loading Dye

Buradaki sonuçlar, Fmoc-Lys ve Fmoc-Lys-Ca²⁺ nanomateryallerin siRNA ile etkileşimi sonucu bir kompleksleşmenin olduğunu ve bu etkileşimin genetik biyomolekülün (siMcl-1) elektroforetik hareketliliği engellenmediğini göstermektedir. İnkübasyon süresinin artması, bahsedilen moleküllerin (Fmoc-Lys-siMcl-1) kompleks oluşturma yeteneğini değiştirmemektedir.

4.7 Akış Sitometrisi ile NM-siRNA'nın HT-29 ve HeLa Kanser Hücrelerine Alınması

Fmoc-Lys NM'lerin siRNA ile komplekslerinin HT-29 ve HeLa hücreleri ile 24 saat inkübasyonundan sonra hücreye alınma yüzde değerleri Şekil 4.17'de verilmiştir.



Şekil 4.17. Farklı konsantrasyonlarda Fmoc-Lys ve Fmoc-Lys-Ca²⁺ NM'lerin siRNA ile komplekslerinin HT-29 (A) ve HeLa (B) hücrelerine girmesi. (37°C'de 24 saat hücre inkübasyonu).

Fmoc-Lys NM'lerin (22.0 µg/mL) siRNA komplekslerinin HT-29 hücreleri ile 24 saat inkübasyonunda hücreye alınma yüzdesinin yaklaşık %14 olduğu görülmektedir (Şekil 4.17A), Fmoc-Lys NM'lerin siRNA komplekslerinin HeLa hücreleri ile 24 saat inkübasyonunda hücreye alınma yüzdesinin ise %8'lik bir değere sahip olduğu görülmektedir (Şekil 4.17B).

Fmoc-Lys NM'lere Ca²⁺ iyonları bağlandığında ise NM yüzey yükünün negatif bölgeye kaydığı önceki çalışmalarımızda verilmişti. Yalın Fmoc-Lys NM'lerin yüzey yükü +19,4 mV olarak ölçülmüşken Ca²⁺ iyonlarıyla etkileşim sonrası, Ca²⁺ iyon derişimine bağlı olarak derişim arttıkça yüzey yükünün de negatife doğru kaydığı görülmüştür (Ç: -19,0 mV). Ca²⁺ iyonlarının NM yüzey yükünde pozitif yönden eksi yöne kayma oluşturmaları normalde beklenen bir durum değildir.

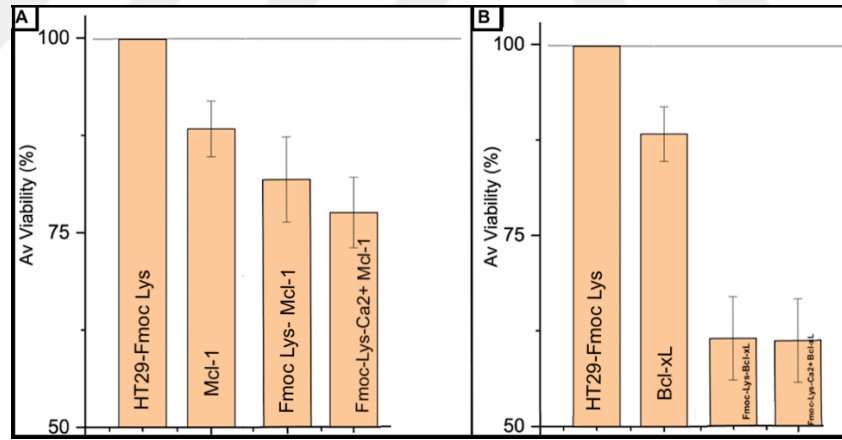
NM yüzey yükündeki eksi yönde oluşan kayma, Fmoc-Lys molekülündeki elektronların delokalizasyonu, delokalize bağların Ca²⁺ iyonları ile etkileşimi, Ca²⁺ iyonlarının 8 moleküle kadar su bağlama özelliği ve ortam pH'sına bağlı olarak bu su moleküllerinin deprotone olması durumları 4.2'deki bölümde açıklanmıştır.

Burada, katyonize olmuş Fmoc-Lys- Ca^{2+} NM'lere kıyasla yalın Fmoc-Lys NM'lerin kanser hücrelerine daha çok girmesinin sebebi yalın Fmoc-Lys NM'lerin yüzeyi pozitifken siRNA negatiftir yani etkileşim daha iyidir. Fmoc-Lys- Ca^{2+} NM'lerin yüzey pozitifliği düşüktür bundan dolayı etkileşim düşük ve bu yüzden hücreye daha az girmiş olabilir.

Elde edilen veriler, Fmoc-Lys NM'lerin, genetik materyalin tümör hücrelerine hücreye alım için umut verici olduğu anlamına gelmektedir. Fmoc-Lys NM'lerin biyoyumlu olup ve siRNA'ların kanser hücrelerine hücreye alım derecesini artırmak adına daha ileri çalışmalar için katkıda bulunabileceği sonucunu ortaya çıkarmıştır.

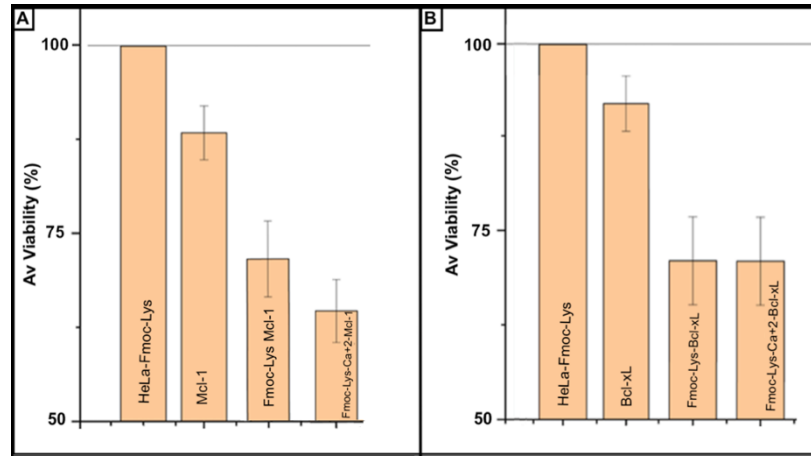
4.8 Tümör Hücrelerine Karşı Fmoc-Lys NM ile siRNA Komplekslerin Sیتotoksitesinin Analizi

Fmoc-Lys NM'lerin siRNA ile inkübasyonunun ardından Fmoc-Lys NM'lerin siRNA (Mcl-1 ve Bcl-xL) kompleksleri ile etkileşiminden sonra HT-29 hücre canlılığı Şekil 4.18'de gösterilmiştir (NM- siRNA ile inkübasyon süresi 25°C'de 30 dakika).



Şekil 4.18. siMcl-1 (A) ve siBcl-xL (B) varlığında ve yokluğunda Fmoc-Lys ve Fmoc-Lys- Ca^{2+} NM'ler (0,88 mg/mL) ile etkileşimden sonra HT-29 hücre canlılığı (37°C'de 24 saatlik inkübasyon).

Fmoc-Lys NM'lerin siRNA ile inkübasyonunun ardından, Fmoc-Lys NM'lerin siRNA (Mcl-1 ve Bcl-xL) kompleksleri ile etkileşiminden sonra HeLa hücre canlılığı Şekil 4.19'da gösterilmiştir (NM- siRNA ile inkübasyon süresi 25°C'de 30 dakika).



Şekil 4.19. siMcl-1 (A) ve siBcl-xL (B) varlığında ve yokluğunda Fmoc-Lys ve Fmoc-Ca²⁺ NM'ler (0,88 mg/mL) ile etkileşimden sonra HeLa hücre canlılığı. (37 °C'de 24 saatlik inkübasyon)

Şekil 4.18 ve Şekil 4.19'daki sonuçlardan görülebileceği gibi 24 saatlik süre sonunda siRNA'lar (Mcl-1 ve Bcl-xL) ile kompleks oluşturan Fmoc-Lys-Ca²⁺ NM'lerle etkileşime giren HT-29 ve HeLa hücrelerin canlılığında azalma gözlenmiştir. HT-29 ve HeLa hücrelerinin yalın siRNA (Mcl-1 ve Bcl-xL) ile etkileşimi sonrası hücrelerde yaklaşık %8–13, Fmoc-Lys-siRNA kompleksler ile etkileştikten sonra hücre canlılığında yaklaşık %18–40 ve Fmoc-Lys-Ca²⁺-siRNA kompleksler ile etkileştikten sonra hücre canlılığında yaklaşık %20–40 azalma olduğu gösterilmiştir.

BCL-2'nin, hücre apoptozu ile ilişkili sinyal yollarını inhibe eden ve hücre canlılığını artıran önemli bir anti-apoptotik protein olduğu rapor edilmiştir (Adams ve Cory., 2018). Şekil 4.18 ve Şekil 4.19'da gösterildiği gibi, Fmoc-Lys-siMcl-1, Fmoc-Lys-siBcl-xL, iki kanser hücre hattında da BCL-2 ekspresyonunu önemli ölçüde inhibe edebilmektedir. Yukarıdaki veriler, komplekslerin kanser hücrelerinde apoptozla ilişkili sinyal yollarını aktive edebileceğini ve ayrıca hücre apoptozunu destekleyebileceğini göstermektedir.

Ancak bu komplekslerin BCL-2 ekspresyonu üzerindeki inhibisyonu iki hücreden HT29 hücre hattında daha başarılıdır. siRNA-Mcl-1 ve siRNA-Bcl-xL' nin anti-kanser mekanizması şu şekildedir: siRNA-Mcl-1/ siRNA-Bcl-xL, Bcl-2 ekspresyonunu inhibe ederek antikanser etkisi sergilediği gözlenmiştir. Bu işlem sırasında siRNA-Mcl-1, BCL-2 protein ekspresyonunu inhibe eder.

Ardından siRNA-Mcl-1'in anti-kanser mekanizmalarından biri olabilecek BCL-2 ile ilişkili anti-apoptotik sinyal yolunu inhibe eder. Burada elde edilen sonuçların, literatür ile kıyaslandığında, uyumlu olduğu görülmektedir (Yuan vd., 2022).

Hücrelerde, sitozoldeki Ca^{2+} derişimdeki istemsiz çoğalmanın apoptozu aktive ettiğı ve hücre içindeki Ca^{2+} depolarından Ca^{2+} salınmasının da pro-apoptotik olarak etken olduğu bilinir. Bunun yanında mitokondri içindeki kalsiyumun fazlası mitokondrinin şişerek zarar görmesine sebep olur. Bu durum mitokondrinin pro-apoptotik yolunda oldukça önemlidir. Mitokondriyal haberleşmenin kesilmesi ise kaspazdan (hücre içi proteazların aktivasyonu) önce meydana gelir (Giorgi vd., 2012). Kanser hücrelerinde kalsiyum iyonlarının kontrolsüz birikmesi, anormal hücre sinyal iletimini indükler (O'Grady ve Morgan., 2021). Son yıllarda, kalsiyum iyonlarının hücreye zarar veren etkileri giderek daha fazla dikkat çekmiş ve hücreye aşırı kalsiyum yüklenmesini sağlayan ve tümör kalsifikasyonunu (birikmesi) tetikleyen kalsiyum bazlı nano-terapötik ajanların geliştirilmesi, yavaş yavaş araştırmaların odak noktası haline gelmiştir (Qi vd., 2018; Zhang vd., 2019).

Sonuç olarak, sitozolde ve mitokondride kalsiyum bir denge halinde bulunur. Şekil 4.18 ve Şekil 4.19'daki sonuçlar değerlendirildiğinde, Ca^{2+} iyonlarının ortamdaki artışının hücre ölümlerinin artışının bir sebebi olarak ve bu dengenin bozulması ile de hücre apoptozunun tetiklenmesi gerçekleşmiştir (Guo vd., 2009; Orrenius ve Nicotera, 1994; Sukumaran vd., 2021).

4.9 Eksozomlar ve Fmoc-Lys NM'lerin Etkileşim Çalışmaları

NM'lerin insan hücrelerine girme yeteneğini araştırmak için çok sayıda çalışma yapılmıştır. Sonuç olarak, NM'lerin boyutu, şekli, yüzey özellikleri, kaplaması, morfolojisi, yüzey yükü, hidrofobikliği, kimyasal bileşimi, yapısı ve topaklanma durumu dahil olmak üzere fizikokimyasal özelliklerini karakterize etmek önemli hale gelmiştir (Zhang vd., 2020). Literatürde EV'lerin etrafında protein-korona oluşumu rapor edilmiştir ve bu korona oluşumu biyoakışkanlarda evrensel olarak meydana gelebilir ve korona bileşenleri çevredeki matris için karakteristik olabilir. Burada korona oluşumunun ardındaki mekanizma muhtemelen protein toplanmasını ve elektrostatik etkileşimleri içermektedir (Tóth vd., 2021).

Fmoc-Lys NM ve SiNP'lerin eksozoma (Exo) karşı davranışını incelemek için bu nanoyapıların eksozom ile etkileşim öncesi ve sonrası zeta potansiyel ve boyutları ölçülmüş ve sonuçlar Çizelge 4.6, Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.6. Fmoc-Lys NM, SiNP ve hücreden türetilen eksozomların Zeta potansiyeli ve Zeta boyutu değerleri.

Örnek	pH	Zeta potansiyel (mV)	Büyüklik (nm)
Fmoc-Lys NM	7,0	+19,40	253,3 nm $\pm$ 12,6
SiNP	7,0	-35,80	78 nm $\pm$ 1,3
Eksozom	7,0	-13,73	101,1 nm $\pm$ 1,5

Çizelge 4.7. Fmoc-Lys-Exo komplekslerinin Zeta potansiyeli ve Zeta boyut değerleri.

Örnek	pH	Zeta potansiyel (mV)	Büyüklik (nm)
Fmoc-Lys (0,5 mg/mL)-Exo	6,5	-6,05	329,4 nm $\pm$ 15,4
Fmoc-Lys (0,5 mg/mL)-Exo	7,0	-7,52	315,3 nm $\pm$ 13,8
Fmoc-Lys (0,5 mg/mL)-Exo	7,4	-8,12	306,8 nm $\pm$ 13,5
Fmoc-Lys (1 mg/mL)-Exo	6,5	-6,51	311,7 nm $\pm$ 13,9
Fmoc-Lys (1 mg/mL)-Exo	7,0	-6,68	306,1 nm $\pm$ 12,4
Fmoc-Lys (1 mg/mL)-Exo	7,4	-8,89	301,2 nm $\pm$ 12,5

Çizelge 4.8. SiNP-Exo komplekslerinin (SiNP-Exo) Zeta potansiyeli ve Zeta boyut değerleri.

Örnek	pH	Zeta potansiyel (mV)	Büyüklik (nm)
SiNP(25 μ g/mL)-Exo	6,5	-11,42	193,8 nm $\pm$ 1,3
SiNP(25 μ g/mL)-Exo	7,0	-16,04	186,5 nm $\pm$ 1,5
SiNP(25 μ g/mL)-Exo	7,4	-26,78	143,1 nm $\pm$ 1,4
SiNP(60 μ g/mL)-Exo	6,5	-16,79	173,5 nm $\pm$ 1,7
SiNP(60 μ g/mL)-Exo	7,0	-23,12	139,7 nm $\pm$ 1,3
SiNP(60 μ g/mL)-Exo	7,4	-26,46	148,4 nm $\pm$ 1,2

Nanoyapılar (Fmoc-Lys NM, SiNP) ve eksozomlar arasındaki etkileşimden sonra yapının yüzeyinde meydana gelen Zeta potansiyeli (ZP) ve Zeta boyutunda (ZS) değişiklikler, biyomolekül koronanın oluştuğunu göstermektedir. Burada analiz edilen Fmoc-Lys NM'ler, SiNP ve eksozom yapılarının pH 7'deki başlangıç ZP değerleri sırasıyla +19,4, -35,8 ve -13,73 mV olarak ölçülürken (Çizelge 4.6), Fmoc-Lys NM'lerin eksozomlarla etkileşimden sonra, ZP'lerinin oldukça negatif olduğu

gözlenmiştir. Bu bulgular, Fmoc-Lys NM'lerin bir korona oluşumuna ve eksozomun yüzeylerinde etkileşime girdiği yapılara katkıda bulunduğunu göstermektedir.

Etkileşim büyük olasılıkla zıt yüklere sahip iki molekül arasında doğal olarak meydana gelen elektrostatik çekime dayanmaktadır. Ayrıca Fmoc-Lys NM'lerin ZS değeri 253,3 nm iken Fmoc-Lys-Exo yapısının boyutları (pH 6,5'da ve 0,5 ile 1 mg/mL Fmoc-Lys NM konsantrasyonlarında) 329,4 nm ve 311,7 nm olarak elde edilmiştir (Çizelge 4.7). Burada etkileşim, zıt yüklere sahip iki molekül arasında doğal olarak meydana gelen elektrostatik etkileşimlere dayanmaktadır. Azalan pH ile Fmoc-Lys-Exo boyutunun arttığını gösteren sonuçlar, eksozomun Fmoc-Lys NM üzerindeki etkileşiminin hafif asidik pH ortamı (pH 6,5) ile arttığını da göstermektedir. Bu sonuç, benzer pH aralıklarında tümör mikro ortamındaki bir uygulama için de geçerli olabilir.

Pozitif yüklü Fmoc-Lys NM'lerle karşılaştırıldığında, negatif yüklü, iyi karakterize edilmiş model NP'lerden olan SiNP'lerle etkileşim çalışmaları da yapıldı (Çizelge 4.8).

ZP değerleri incelendiğinde SiNP'lerin eksozomlarla inkübasyonundan sonra azalan pH'ya bağlı olarak göreceli bir pozitivite kazandığı gözlenmiştir. Burada moleküller arası kuvvetlere dayanarak komşu parçacıklar arasındaki etkili çekim veya itme kuvvetine dayalı etkileşimin aktif olduğu söylenebilir. Bu kuvvetlerin molekülleri bir arada tutan iç kuvvetlerden daha zayıf olduğu bilinmektedir. Burada yine Fmoc-Lys NM'lere benzer şekilde en büyük eksozom katmanının pH 6,5'te olduğu görülmektedir. Bu sonuçlara dayanarak sonraki deneylere pH 6,5 deney koşulları dikkate alınarak devam edilmiştir.

Özetle, sonuçlarımız Fmoc-Lys NM-Exo yapılarının elektrostatik etkileşimle daha büyük bir eksozom biyomolekül koronası oluşturduğunu göstermektedir. Elde edilen sonuçlara dayanarak, moleküller arası kuvvetlerin eksozom korona üzerinde ciddi etkisi olduğu gözlenmiştir. Ayrıca artan Fmoc-Lys NM ve SiNP konsantrasyonlarıyla birlikte eksozom korona yapısının hafifçe azaldığı gözlenmiş, bu durum, ortamdaki düşük NM konsantrasyonlarının koronal kalınlık için yeterli olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, eksozom korona kalınlığı nispeten düşük nanoyapı konsantrasyonunda daha büyüktür ve ortamdaki parçacık sayısının artmasının, koronal kalınlık üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığı gözlenmiştir.

4.10 Kolloidal Stabilite Çalışmaları

NM'lerin toplanarak bir araya gelmesi, sonuçları etkileyecek ve deneylerin tekrarlanabilirliğini engelleyebilecek sonuçları doğurabilir. Bu durum, öncelikle hücreye girişi değiştirebilir ve parçacıkların toksisitesini etkileyebilir. Her ne kadar NMlerin hücrel tepkilerini değerlendirmek için kullanılan *in vitro* sistemler giderek artsa da, fizyolojik sıvılarda asılı kaldıklarında kolloidal özelliklerinde meydana gelebilecek potansiyel değişiklikler sıklıkla göz ardı edilmektedir. Bununla birlikte, artan boyutun hücrel tepkiyi doğrudan etkilediği ve değişen difüzyon ve sedimentasyon hızlarının da dolaylı olarak etkilediği kanıtlanmıştır. Sonuç olarak, NM toplanmasını dikkate almak ve NM toplanmasını etkileyen faktörleri anlamak önemlidir (Moore vd., 2015).

Çekici van der Waals kuvvetleri, NM'lerin atomlar arası bağlar içindeki indüklenmiş, anlık veya kalıcı dipoller oluşturmaktan kaynaklanır ve kolloidal sistemin istikrarsızlaşmasına yol açar. NM'lerin elektrostatik çift katmanı bu çekici van der Waals kuvvetlerini iter ve böylece dağılım stabilizasyonunu sağlar. Çoğu NM'ler, sulu ortamlarda yüzey gruplarının iyonlaşması veya ayrışması, yüklü moleküllerin veya iyonların parçacık yüzeyine adsorpsiyonunun bir sonucu olarak belirli bir yüzey yükü kazanır. Genel yük dengesini korumak için parçacığın etrafında karşı bir iyon bulutu oluşur (Moore vd., 2015; Auría-Soro vd., 2019; Butkus ve Grasso, 1998).

Kolloidal stabilite için zeta potansiyel ve zeta boyut değerleri Çizelge 4.9'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.9. Kolloidal stabilite için Zeta potansiyeli ve Zeta boyutu değerleri.

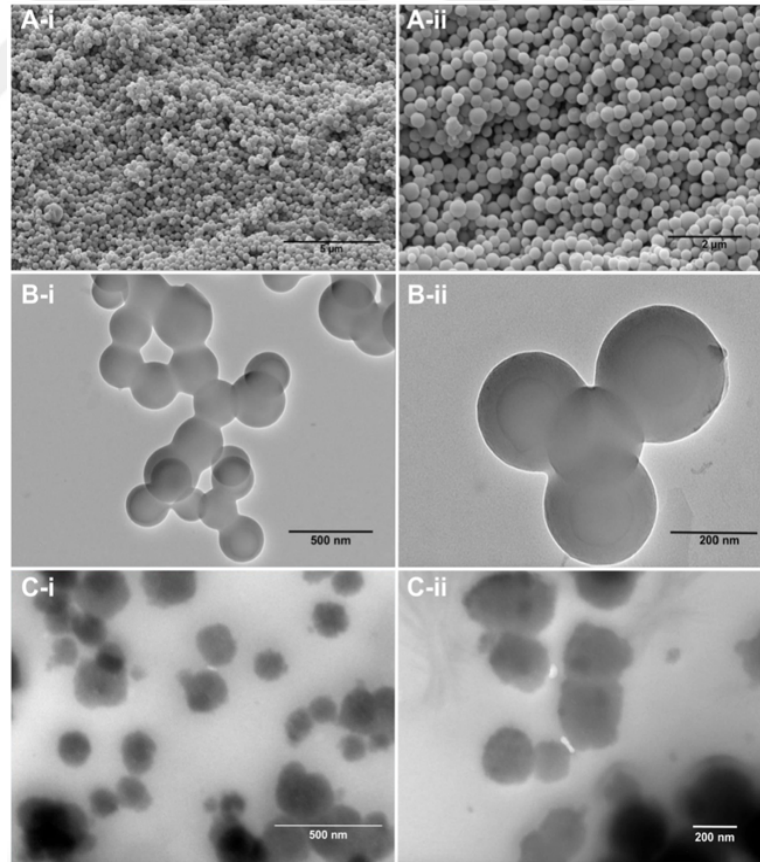
Örnek	pH	Zeta potansiyel (mV)	Büyüklik (nm)
Eksozom (0,2 µg/mL)	6,5	-23,12	429,4 nm ± 1,4
Fmoc-Lys NM (0,5 mg/mL)-Exo	6,5	-6,19	351 nm ± 1,2
SiNP (25 µg/mL)-Exo	6,5	-13,4	143,1 nm ± 1,5

Bir kolloid sistemindeki bir parçacığın zeta potansiyeli, stabilitenin önemli bir bileşenidir çünkü bunların aralarında oluşan yapıların topaklanmasını etkiler. Bu çalışmada, 72 saatlik sonuçlar, elektrostatik olarak etkileşime giren Fmoc-Lys NMs-Exo yapılarının, nispeten zayıf etkileşime giren SiNP-Exo yapısından daha kararlı olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.9). Yani zıt kutuplar arasında elektrostatik bir

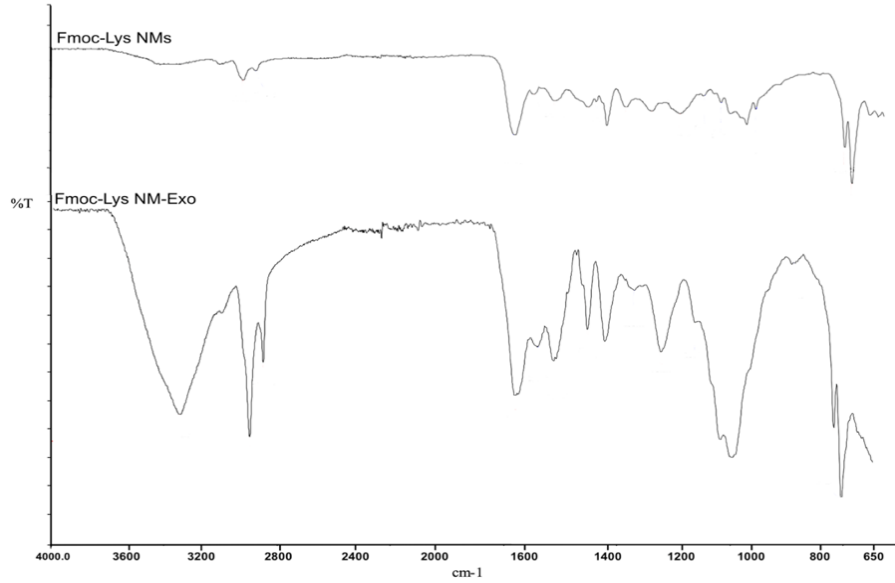
çekim kuvveti oluşması ve bunun sonucunda doğal olarak daha kararlı bir yapının oluşmasına bağlanabilir. Çalışmanın sonucunda, 72 saatlik inkübasyonun ardından muhtemelen kümelenmelerinin bir sonucu olarak, eksozomların boyutunda bir artış da gözlemlenmiştir.

4.11 Fmoc-Lys-Exo Yapılarının Karakterizasyonu

Fmoc-Lys NM'lerin eksozomlarla etkileşim öncesi ve sonrası SEM ve TEM görüntüleri Şekil 4.20'de verilmiştir. Görüntülerden, yalın Fmoc-Lys NM'lerin (Şekil 4.20 A ve B), eksozomlarla inkübasyonundan sonra (Şekil 4.20 C) yapılarında şekilsel ve boyutsal değişimler gözlemlenmiştir. Ayrıca Fmoc-Lys NM'lerin eksozomlarla etkileştikten sonra biyolojik sıvı etkisinden dolayı bulut benzeri bir yapıyla çevrelendiği de Şekil 4.20 C'deki TEM görüntülerinden gözlemlenmektedir. Korona yapısının etkisinin Fmoc-Lys NM'leri çevreleyen eşit ve çok yönlü olmayan bir ağ oluşturması da korona yapısının bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.20. Fmoc-Lys NM'lerin SEM (A) ve TEM görüntüleri (B), Fmoc-Lys-Exo yapısının TEM görüntüsü (C).



Şekil 4.21. Fmoc-Lys NM'ler, Fmoc-Lys-Exo yapıları için alınan (ATR-FTIR) spektrumları.

Eksozomlar nükleik asitler, lipitler, proteinler vb. dahil olmak üzere çok çeşitli biyoaktif maddeler içermektedir (Zhang vd., 2020). Burada, ATR-FTIR analizleri, sentezlenen Fmoc-Lys NM'leri ve oluşturulan Fmoc-Lys-Exo yapılarını karakterize etmek için yapıldı ve analiz sonuçları Şekil 4.21'de verildi. Burada görüldüğü üzere her iki spektrum için 1525 cm^{-1} 'deki pikler birincil amin gruplarının N-H bükülmesine, 1630 civarındaki absorpsiyon bantları, amid gruplarının C=O gerilmesine, 1590 cm^{-1} civarındaki pikler, her iki yapı için de birincil amin grubunun NH_2 bükülmesine atfedilmiştir. Spektrumlardaki 2950 ve 2890 cm^{-1} 'deki absorpsiyon bantları, kendi kendine birleşme işlemi sırasında çapraz bağlayıcı olarak kullanılan gluteraldehitin (GA) sırasıyla C-H asimetrik ve simetrik gerilmesine atfedilmiştir. 3300 cm^{-1} 'deki zirve, Fmoc-Lys-Exo'nun eksozom yapısındaki asimetrik S=O gerilme titreşimlerine atfedildi. $900\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$ civarındaki gerilme pikleri eksozom yapısında P-OH'ye atfedildi. Eksozom yapısındaki hidrojen bağlı hidroksil gruplarının karakteristik esneme titreşim bantları Fmoc-Lys-Exo'da 3300 cm^{-1} civarında görülmektedir. ATR-FTIR analiz sonuçları Fmoc-Lys NM'lerde eksozom korona yapısının oluştuğunu desteklemektedir.

4.12 Hücre Canlılığı Çalışmaları

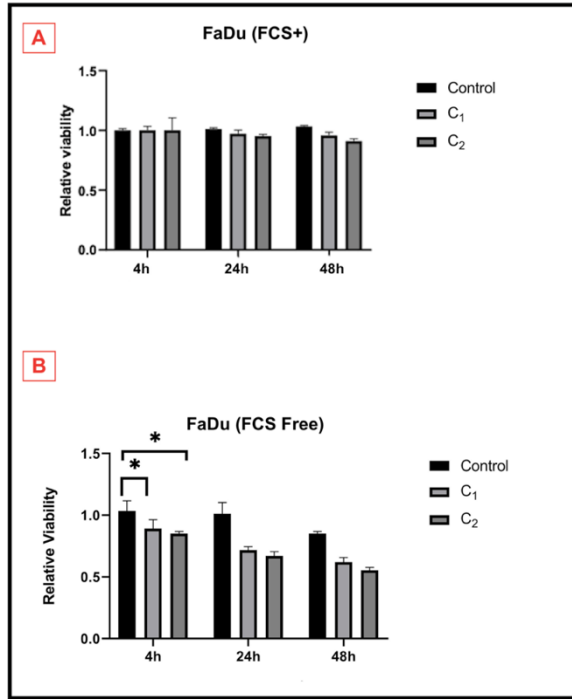
Nanomalzemelerin uygulanmasında karşılaşılan en büyük sorunlardan biri biyogüvenliktir. Nanomateryallerin, biyolojik vücut sıvılarına girdikten sonra

biyoakışkanlarda bulunan proteinler, lipitler ve diğer maddeler gibi biyomolekülleri hızla bağladığı gözlemlenmiştir (Lobb vd., 2015). Bu biyomoleküller arasında proteinler baskın bileşenler olarak tanımlanıyor ve bu da "protein korona" olarak bilinen olgunun ortaya çıkmasına neden oluyor. Buradaki çalışmamızda NP'lerin yüzeyine adsorbe edilen eksozomların NP'lere biyolojik kimlik sağladığı ve NP'ler ile hücreler arasındaki etkileşimi etkilediği de açıkça görülmektedir.

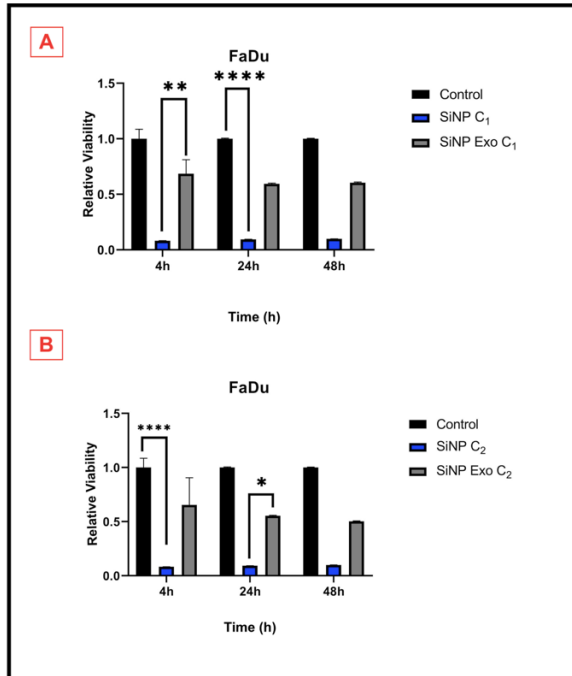
Bu nedenle baş ve boyun kanseri hücre dizisi FaDu, fetal dana serumu (FCS+ veya -) varlığında ve yokluğunda Fmoc-Lys NM'ler (0,5 mg/mL; 1 mg/mL) ile tedavi edildi. İlk olarak çalışmamız, serum varlığında FaDu hücre çizgileri üzerinde düşük toksisite ile gösterilen ve dolayısıyla bir biyomolekül korona elde edildikten sonra Fmoc-Lys NM'lerin yüksek biyoyumluluğunu kanıtladı. Buna karşılık serum yokluğunda, Fmoc-Lys NM tedavisinden sonra FaDu hücrelerinin canlılığının önemli ölçüde azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.22).

Bir serum ortamında serum proteinleri mevcut olduğundan, NM'ler serum proteinleri ile etkileşime girecek ve dolayısıyla NM'lerin toksisitesinde bir azalmaya yol açacaktır (Midekessa vd., 2020).

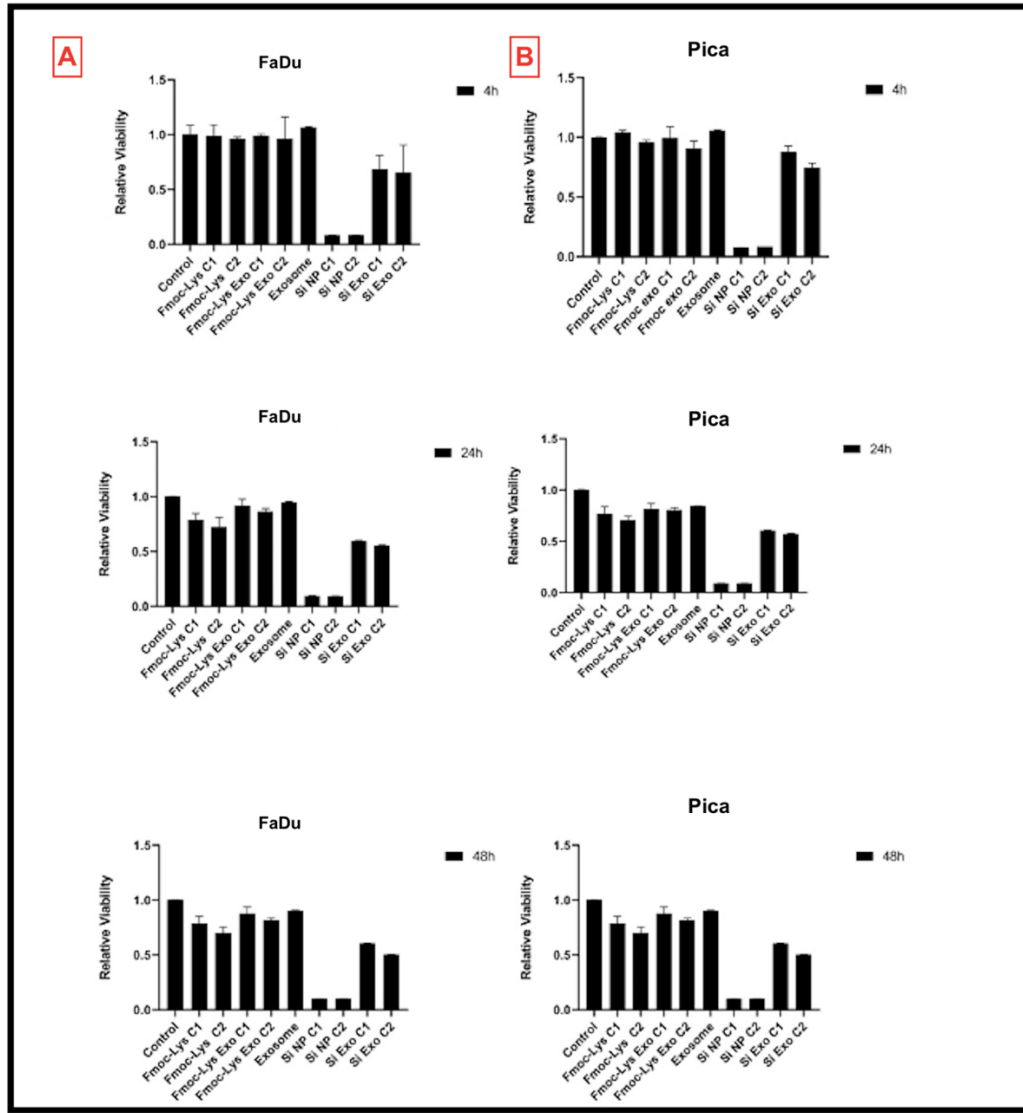
Hücre canlılığı testleri, FCS+ ortamında (A) ve FCS içermeyen ortamda (B) farklı konsantrasyonlardaki (C₁: 0,5 mg/mL; C₂: 1 mg/mL) Fmoc-Lys NM'lerle etkileşime bırakılan FaDu hücreleriyle gerçekleştirildi. İlk kez, Fmoc-Lys NM'ler etrafında eksozom bazlı bir koronanın edinilmesinin, SiNP'lerin hücrelere yönelik toksisitesini önemli ölçüde azalttığını da gösterilmiştir (Şekil 4.22 ve Şekil 4.23). Burada, ana hücrelerden izole edilen eksozomların SiNP'ler ve Fmoc Lys NM'ler ile etkileşiminin, nanoyapıların görünürdeki toksik etkilerini ortadan kaldırdığı ve onlara yeni bir kimlik kazandırarak hücreler üzerindeki toksik etkilerini önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4.22. FCS+ ortamında (A) ve FCS içermeyen ortamda (B) farklı konsantrasyonlarda (C₁: 0,5 mg/mL; C₂: 1 mg/mL) hazırlanan Fmoc-Lys NM'lerin FaDu hücre canlılığı testleri. $\pm$ S.D. *, * p < 0,05 (C: Konsantrasyon).



Şekil 4.23. FCS içermeyen ortamda farklı konsantrasyonlarda (C₁: 25 μ g/mL C₂: 60 μ g/mL) hazırlanan SiNP'lerin FaDu hücre canlılığı testleri. $\pm$ S.D. **, p < 0,01, ***, p < 0,001.



Şekil 4.24. FCS içermeyen ortamda FaDu (A) ve HNC (B) hücre canlılığı testleri. Fmoc-Lys NM'ler (C₁: 0,5 mg/mL; C₂: 1 mg/mL), Fmoc-Lys NM's-Exo (C₁: 0,5 mg/mL-0,2 µg/mL; C₂: 0,5 mg/mL-0,2 µg/mL), SiNP (C₁: 25 µg/mL; C₂: 60 µg/mL), SiNP-Exo (C₁: 25 µg/mL- 0,2 µg/mL; C₂: 60 µg/mL- 0,2 µg/mL) ve Eksozom (C: 0,2 µg/mL) FCS içermeyen ortamda farklı konsantrasyonlarda hazırlanmıştır.

Gelecek, NM'lerin çeşitli alanlarda, özellikle de klinik tanı ve tedavi amaçlı immünoterapide yaygın olarak kullanılması konusunda umut vericidir. Bu bağlamda, NM'lerin etkinliği boyutları, biyoyumlulukları, yüzey kimyası ve ayarlanabilir toksisite gibi faktörlere bağlıdır. İmmünoterapinin nanotıpla entegrasyonu, tümör hücrelerine sızma, seçici olarak hedefleme ve yok etme yetenekleri ile çeşitli kanser türleriyle mücadelede uygulanabilir bir yaklaşım sunar.

Günümüzde protein koronanın protein-nanomateriyal ikilisine dayalı olduğu düşünülse de literatürde eksozom gibi farklı biyoakışkanlarla biyomolekül koronanın oluşabileceğini gösteren bazı çalışmalar da vardır (Gregory, 1981). Ancak bir diğer önemli nokta da biyoakışkanlarda protein korona oluşumuna katkıda bulunan faktörlerin yeterince anlaşılamamasıdır (Heidarzadeh, 2023).

Bu bölümdeki çalışmada, eksozomun biyokoronaya katkıda bulunarak nanoyapıların toksisitesini önemli ölçüde azalttığını gösterdik. Bu amaçla Fmoc-Lys NM'ler sentezlendi ve karakterize edildi. DLS deney sonuçlarına göre HNC (Head and Neck Cancer (baş ve boyun kanseri)) hücre hatlarından elde ettiğimiz negatif yüklü eksozomların pozitif yüklü Fmoc-Lys NM'ler ile etkileşime girdiği ve bunun sonucunda Fmoc-Lys NM-Exo yapılarının Fmoc-Lys NM yapılarına göre daha az toksik olduğu gösterilmiştir. Bu durumu doğrulamak için negatif yüklü SiNP ile de çalışmalar yapılmış ve sonuçlar eksozomlar ile etkileşime giren yapıların daha az toksik olduğunu bir kez daha kanıtlamıştır.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre hücre canlılığı için Fadu hücre hattıyla yaptığımız çalışmalar benzer hücre canlılığı sonuçlarıyla çalışmamızı doğruladı. Ayrıca Fmoc-Lys-Exo yapılarının elektrostatik etkileşiminin SiNP-Exo yapılarında meydana gelen zayıf etkileşimlere göre daha stabil olduğu, dolayısıyla Fmoc Lys-Exo yapısının kolloidal stabilitesinin daha iyi olduğu ortaya çıkmıştır.

Bu sonuçlara ek olarak, NM'lerin kolloidal stabilitesi, etkileşimin gücüne bağlı olarak biyokoronaya katkıda bulunabileceği sonucunu da ortaya çıkarmıştır. Bu aynı zamanda güçlü etkileşimlerin daha stabil bir NM-Exo biyokorona oluşturabileceğini de göstermektedir. Burada elde edilen bilgiler ışığında eksozomların gelecekteki kanser tedavilerinde toksisiteyi azaltmaya yardımcı olan son derece umut verici ajanlar olduğu sonucuna varılabilir.

Eksozomların tüm biyolojik sıvılarda mevcut olduğu gerçeği göz önüne alındığında, NM'ler üzerinde ayrı bir korona oluşumunda belirleyici bir rol oynarlar ve dolayısıyla NM'lerin yüzey kimliğini temelden değiştirme potansiyeline sahip olabileceği gerçeği hep vardır. Eksozomlar, hedeflenen hücre iletişimi için araç olarak kullanılır ve çok sayıda biyolojik aktif kargo taşır.

Sonuç olarak, NM'lerin fonksiyonel yapıdaki eksozomlarla dekorasyonu, yalnızca NM'lerin amaçlanan işlevini değil aynı zamanda bunların hedeflenmesini, hücre alımını ve hücre ortamdaki karakterini de etkileyebilir. Bu nedenle, sonuçlarımız aynı zamanda eksozomların NM bazlı tedavilerde toksisiteyi azaltmaya yardımcı olabilecek son derece umut verici ajanlar olduğunu da göstermektedir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Peptit yapıları biyoyumluluk, sentez kolaylığı, işlevsellik ve kontrol edilebilir biyoaktivite ve ayrıca yapılarını çevre koşullarına adaptasyonları gibi önemli özellikleri ile bilim dünyasında büyük ilgi görmektedirler. Dipeptitler de peptitlerin alt üyeleridir ve benzer özellikleri sergilerler.

Bu tez kapsamında, ticari olarak elde edilen Fmoc-Lys monomerlerinin öz düzenlemeleri ile Fmoc-Lys NM'ler sentezlendi ve oluşan NM'lerin LC-MS/MS analizi sonucu elde edilen bulgular incelendiğinde monomer Fmoc-Lys moleküllerinin GA ile 4 saatlik etkileşimlerinin sonunda Fmoc-Lys NM'lerin oluştuğu görüldü. Ayrıca, etkileşime girmemiş Fmoc-Lys monomerlerin analiz sonucu ortamda varlığını arastırılmadı. Bu durum, Fmoc-Lys NM'lerin 4 saatlik süre sonunda yüksek verimde elde edildiğini göstermiştir. Ardından, Fmoc-Lys NM'lerin sentezini fonksiyonel gruplar üzerinden de doğrulamak için ATR-FTIR analizleri sonuçları da incelenmiş Fmoc-Lys NM'lerin amin grupları ile GA'nın aldehit gruplarının varsayıldığı gibi çapraz bağlandıkları gözlenmiştir.

Fmoc-Lys NM'lerin yüzey net yükleri +19,4 mV olarak ölçülmüştür ve bu değer hücre etkileşim çalışmaları için ideal bir yükür. Fakat, Ca^{2+} iyonları ile dekorasyonun hücre etkileşimindeki etkisini de görmek adına Fmoc-Lys NM'ler saf suda hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ çözeltileriyle etkileştirilmiştir. Ca^{2+} iyon derişimlerinin artırılmasıyla yüzey yük potansiyellerinin eksi yüke doğru (ζ : -19,0 mV) kayma gösterdiği gözlenmiştir.

Fmoc-Lys NM ve Fmoc-Lys- Ca^{2+} NM'lerin farklı biyomoleküllerle (HSA, IgG ve DNA) korona oluşumları incelenmiş, yürütölen çalışmalarda, boyut ve yüzey yükü değışiklikleri ile birlikte nanoyapıların yüzeyinde bir korona tabakası oluşumu gözlenmiştir. Fmoc-Lys NM'lerin tümör hücrelerine karşı sitotoksite analizleri de incelenmiş, Elde edilen verilere dayanarak, Fmoc-Lys NM'ler ve Fmoc-Lys- Ca^{2+} NM'lerin HeLa ve HT-29 hücre hatları için toksik olmadığı gözlenmiştir. siRNA'nın Fmoc-Lys ve Fmoc-Lys- Ca^{2+} nanomateryalleri ile komplekslerinin zeta potansiyel ölçümleri sonucunda, siRNA'nın yüzey potansiyelinin negatif yüke ve Fmoc-Lys NM'lerin ise pozitif yüke sahip olmasından dolayı herhangi bir modifikasyona gerek kalmadan etkileşime girmelerinin önemli bir avantaj olduğu sonucuna varılmıştır.

siRNA'nın Fmoc-Lys ve Fmoc-Lys-Ca²⁺ nanomateryalleri ile komplekslerinin agaroz jel elektroforez ölçümleri sonucunda NM'lerin siRNA ile etkileşimi sonucu genetik biyomolekölün (siMcl-1) elektroforetik hareketliliğinin engellenmediğini görülmüştür. İnkübasyon süresinin artması, bahsedilen moleküllerin (Fmoc-Lys-siMcl-1) kompleks oluşturma yeteneğini değiştirmemektedir.

Fmoc-Lys NM'lerin siRNA komplekslerinin HT-29 hücreleri ile 24 saat inkübasyonunda hücreye alınma yüzdesi yaklaşık %14 iken, Fmoc-Lys NM'lerin siRNA komplekslerinin HeLa hücreleri ile 24 saat inkübasyonunda hücreye alınma yüzdesi %8'e kadar bir değere sahip olduğu görülmüştür.

Fmoc-Lys NM'lerin siRNA ile 24 saatlik inkübasyonunun ardından Fmoc-Lys NM'lerin siRNA (Mcl-1 ve Bcl-xL) kompleksleri ile etkileşiminden sonra HT-29 ve HeLa hücre canlılığında azalma gözlenmiştir.

Fmoc-Lys NM'lerin eksozomlarla etkileşim çalışmaları için eksozomlar sentezlenmiş, karakterize edilmiş ve yapılan etkileşim çalışmaları sonucunda, morfolojik yapının ve gerekse fonksiyonel grup analiz doğrulamaları için SEM, TEM ve ATR-FTIR analizleri yapılmıştır. Yüzey yükü ve büyüklük açısından da zeta potansiyel ve yükünden Fmoc-Lys NM'lerin yapılarının değiştiği açıkça görülmüştür.

Pozitif yüklü Fmoc-Lys NM'lerle karşılaştırıldığında, negatif yüklü, iyi karakterize edilmiş model NP'lerden olan SiNP'lerle etkileşim çalışmaları da yapılmış ve Fmoc-Lys NMs-Exo yapılarının elektrostatik etkileşimle bir eksozom biyomolekül koronası oluşturduğu görülmüştür.

Kolloidal stabilite çalışmaları için ise 72 saatlik etkileşim sonucunda Fmoc-Lys NM'ler ve SiNP yapıları ile PBS tamponunda (4 °C, pH 6,5) etkileşime bırakılarak yapıların stabilitesi ve son yükleri ile boyutları ölçülmüştür. Burada, elektrostatik olarak etkileşime giren Fmoc-Lys NMs-Exo yapılarının nispeten zayıf etkileşime giren model SiNP-Exo yapısından daha kararlı olduğu sonucu ortaya çıkmıştır. Zıt kutuplar arasında meydana gelen elektrostatik bir çekim kuvveti sonucu daha kararlı bir yapının olduğu gözlenmiştir. İnkübasyonun ardından etkileşimlerle birlikte eksozomların boyutunda bir artış da gözlenmiştir.

Eksozom yapılarının biyokoronaya katkıda bulunarak nanomateryallerin toksisitesini azalttığını Pica hücre hatlarından elde ettiğimiz negatif yüklü eksozomların pozitif yüklü Fmoc-Lys NM'ler ile etkileşime girdiği ve bunun sonucunda Fmoc-Lys NM-Exo yapılarının Fmoc-Lys NM yapılarına göre daha az toksik olduğu gözlenmiştir. Bu durumu doğrulamak için negatif yüklü SiNP ile de çalışmalar yapılmış ve sonuçlar eksozomlar ile etkileşime giren yapıların daha az toksik olduğunu bir kez daha kanıtlamıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda hücre canlılığı için FaDu hücre hattıyla yaptığımız çalışmalar benzer hücre canlılığı sonuçlarıyla çalışmamızın doğrulanması sağlanmıştır. Ayrıca, Fmoc-Lys-Exo yapılarının elektrostatik etkileşiminin SiNP-Exo yapılarında meydana gelen zayıf etkileşimlere göre daha stabil olduğu, dolayısıyla Fmoc Lys-Exo yapısının kolloidal stabilitesinin daha iyi olduğu ortaya çıkmıştır.

KAYNAKLAR

- Aatonen, M. T., Öhman, T., Nyman, T. A., Laitinen, S., Grönholm, M. ve Siljander, P. R. M., 2014. Isolation and characterization of platelet-derived extracellular vesicles, *Journal of Extracellular Vesicles*, 3, 1, 24692.
- Abbas, M., Zou, Q., Li, S. ve Yan, X., 2017. Self-assembled peptide-and protein-based nanomaterials for antitumor photodynamic and photothermal therapy, *Advanced Materials*, 29, 12, 1605021.
- Abhange, K., Makler, A., Wen, Y., Ramnauth, N., Mao, W., Asghar, W. ve Wan, Y., 2021. Small extracellular vesicles in cancer, *Bioactive Materials*, 6, 11, 3705-3743.
- Acet, Ö., 2023. Design of enhanced smart delivery systems for therapeutic enzymes: kinetic and release performance of dual effected enzyme-loaded nanopolymers, *Catalysis Letters*, 153, 10, 3174-3184.
- Acet, Ö., Shcharbin, D., Zhogla, V., Kirsanov, P., Halets-Bui, I., Acet, B. Ö., Gök, T., Bryszewska, M. ve Odabaşı, M., 2023. Dipeptide nanostructures: Synthesis, interactions, advantages and biomedical applications, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 222, 113031.
- Adams, J. M. ve Cory, S., 2007. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy, *Oncogene*, 26, 9, 1324-1337.
- Adams, J. M. ve Cory, S., 2018. The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets, *Cell Death & Differentiation*, 25, 1, 27-36.
- Adler-Abramovich, L., Aronov, D., Beker, P., Yevnin, M., Stempler, S., Buzhansky, L., Rosenman, G. ve Gazit, E., 2009. Self-assembled arrays of peptide nanotubes by vapour deposition, *Nature Nanotechnology*, 4, 12, 849-854.
- Aflori, M., 2021. Smart nanomaterials for biomedical applications—a review, *Nanomaterials*, 11, 2, 396.
- Akers, J. C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B. S. ve Chen, C. C., 2013. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies, *Journal of Neuro-oncology*, 113, 1-11.
- Ali, E. S., Sharker, S. M., Islam, M. T., Khan, I. N., Shaw, S., Rahman, M. A., Uddin, S. J., Shill, M. C., Rehman, S., Das, N., Ahmad, S., Shilpi, J. A., Tripathi, S., Mishra, S. K. ve Mubarak, M. S., 2021. Targeting cancer cells with nanotherapeutics and nanodiagnostics: Current status and future perspectives, *In Seminars in Cancer Biology*, 69, 52-68
- Ali, I., Alsehli, M., Scotti, L., Tullius Scotti, M., Tsai, S. T., Yu, R. S., Hsieh, M. F. ve Chen, J. C., 2020. Progress in polymeric nano-medicines for theranostic cancer treatment, *Polymers*, 12, 3, 598.

- Allen, T. M. ve Cullis, P. R., 2004. Drug delivery systems: entering the mainstream, *Science*, 303, 5665, 1818-1822.
- Auría-Soro, C., Nesma, T., Juanes-Velasco, P., Landeira-Viñuela, A., Fidalgo-Gomez, H., Acebes-Fernandez, V., Gongora, R., Parra, M. J. A., Manzano-Roman, R. ve Fuentes, M., 2019. Interactions of nanoparticles and biosystems: microenvironment of nanoparticles and biomolecules in nanomedicine, *Nanomaterials*, 9, 10, 1365.
- Banik, B. L., Fattahi, P. ve Brown, J. L., 2016. Polymeric nanoparticles: the future of nanomedicine, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 8, 2, 271-299.
- Batrakova, E. V. ve Kim, M. S., 2015. Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 219, 396-405.
- Baulcombe, D. C., 2000. Unwinding RNA silencing, *Science*, 290, 5494, 1108-1109.
- Benoit, D. S. ve Koo, H., 2016. Targeted, triggered drug delivery to tumor and biofilm microenvironments, *Nanomedicine*, 11, 8, 873-879.
- Berridge, M. V. ve Tan, A. S., 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303, 2, 474-482.
- Blanco, E., Shen, H. ve Ferrari, M., 2015. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery, *Nature Biotechnology*, 33,9, 941-951.
- Boyiadzis, M. ve Whiteside, T. L., 2015. Information transfer by exosomes: A new frontier in hematologic malignancies, *Blood Reviews*, 29, 5, 281-290.
- Bozdoğan, B., Akbal, Ö., Çelik, E., Türk, M. ve Denkbaş, E. B., 2017. Novel layer-by-layer self-assembled peptide nanocarriers for siRNA delivery, *RSC Advances*, 7, 75, 47592-47601.
- Brini, M., Calì, T., Ottolini, D. ve Carafoli, E., 2013. Intracellular calcium homeostasis and signaling, *Metallomics and the Cell*, 119-168.
- Brini, M., Ottolini, D., Calì, T. ve Carafoli, E., 2013. Calcium in health and disease, *Interrelations Between Essential Metal ions and Human Diseases*, 81-137.
- Brinton, L. T., Sloane, H. S., Kester, M. ve Kelly, K. A., 2015. Formation and role of exosomes in cancer. *Cellular and molecular life sciences*, 72, 659-671.7. Edlich, F. (2018). BCL-2 proteins and apoptosis: Recent insights and unknowns, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 500, 1, 26-34.

- Brownlee, Z., Lynn, K. D., Thorpe, P. E. ve Schroit, A. J., 2014. A novel “salting-out” procedure for the isolation of tumor-derived exosomes, *Journal of Immunological Methods*, 407, 120-126.
- Brumano, L. P., da Silva, F. V. S., Costa-Silva, T. A., Apolinário, A. C., Santos, J. H. P. M., Kleingesinds, E. K., Monteiro, G., Rangel-Yagui, C. O. ve Junior, A. P., 2019. Development of L-asparaginase biobetters: current research status and review of the desirable quality profiles, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6, 212.
- Butkus, M. A. ve Grasso, D., 1998. Impact of aqueous electrolytes on interfacial energy, *Journal of Colloid and Interface Science*, 200, 1, 172-181.
- Caenepeel, S., Brown, S. P., Belmontes, B., Moody, G., Keegan, K. S., Chui, D., Whittington, D. A., Huang, X., Poppe, L., Cheng, A. C., Cardozo, M., Houze, J., Li, Y., Lucas, B., Paras, N. A., Wang, X., Taygerly, J. P., Vimolratana, M., Zancanella, M., Zhu, L., Cajulis, E., Osgood, T., Sun, J., Damon, L., Egan, R. K., Greninger, P., McClanaghan, J. D., Gong, J., Moujalled, D., Pomilio, G., Beltran, P., Benes, C. H., Roberts, A. W., Huang, D. C., Wei, A., Canon, J., Coxon, A. ve Hughes, P. E., 2018. AMG 176, a selective MCL1 inhibitor, is effective in hematologic cancer models alone and in combination with established therapies, *Cancer Discovery*, 8, 12, 1582-1597.
- Cafaggi, S., Russo, E., Stefani, R., Leardi, R., Caviglioli, G., Parodi, B., Bignardi, G., Toterò, D. D., Aiello, C. ve Viale, M., 2007. Preparation and evaluation of nanoparticles made of chitosan or N-trimethyl chitosan and a cisplatin–alginate complex, *Journal of Controlled Release*, 121, 1-2, 110-123.
- Caracciolo, G., Pozzi, D., Capriotti, A. L., Cavaliere, C., Piovesana, S., La Barbera, G., Amici, A. ve Laganà, A., 2014. The liposome–protein corona in mice and humans and its implications for *in vivo* delivery, *Journal of Materials Chemistry B*, 2, 42, 7419-7428.
- Castillo-León, J., Andersen, K. B. ve Svendsen, W. E., 2011. Self-assembled peptide nanostructures for biomedical applications: advantages and challenges, *Biomaterials Science and Engineering*, 10, 23322.
- Cedervall, T., Lynch, I., Lindman, S., Berggård, T., Thulin, E., Nilsson, H., Dawson, K. A. ve Linse, S., 2007. Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 7, 2050-2055.
- Chang, L., Bao, H., Yao, J., Liu, H., Gou, S., Zhong, C., Zhang, Y. ve Ni, J., 2021. New designed pH-responsive histidine-rich peptides with antitumor activity, *Journal of Drug Targeting*, 29, 6, 651-659.

- Chen, C., Pan, F., Zhang, S., Hu, J., Cao, M., Wang, J., Xu, H., Zhao, X. ve Lu, J. R., 2010. Antibacterial activities of short designer peptides: a link between propensity for nanostructuring and capacity for membrane destabilization, *Biomacromolecules*, 11, 2, 402-411.
- Chen, J., Li, P., Zhang, T., Xu, Z., Huang, X., Wang, R. ve Du, L., 2022. Review on strategies and technologies for exosome isolation and purification, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 811971.
- Chen, J., Zhang, B., Xia, F., Xie, Y., Jiang, S., Su, R., Lu, Y. ve Wu, W., 2016. Transmembrane delivery of anticancer drugs through self-assembly of cyclic peptide nanotubes, *Nanoscale*, 8, 13, 7127-7136.
- Chen, X., Yang, H., Song, X., Liang, H., Wei, Y., Lu, J., Barz, M., Jin, L. ve Nie, Y., 2023. Integrated and dual-responsive lipopeptide nanovector with parallel effect to tumor and micro-environment regulation by efficient gene and drug co-delivery, *Chinese Chemical Letters*, 34, 5, 107753.
- Cheng, Z., Li, M., Dey, R. ve Chen, Y., 2021. Nanomaterials for cancer therapy: current progress and perspectives, *Journal of Hematology & Oncology*, 14, 1-27.
- Chun, C., Lee, S. M., Kim, S. Y., Yang, H. K. ve Song, S. C., 2009. Thermosensitive poly (organophosphazene)-paclitaxel conjugate gels for antitumor applications, *Biomaterials*, 30, 12, 2349-2360.
- Colao, I. L., Corteling, R., Bracewell, D. ve Wall, I., 2018. Manufacturing exosomes: a promising therapeutic platform, *Trends in Molecular Medicine*, 24, 3, 242-256.
- Colombo, M., Raposo, G. ve Théry, C., 2014. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30, 255-289.
- Colombo, S., Beck-Broichsitter, M., Bøtker, J. P., Malmsten, M., Rantanen, J. ve Bohr, A., 2018. Transforming nanomedicine manufacturing toward Quality by Design and microfluidics, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 128, 115-131.
- Cook, A. B. ve Decuzzi, P., 2021. Harnessing endogenous stimuli for responsive materials in theranostics, *ACS Nano*, 15, 2, 2068-2098.
- Cook, A. B. ve Perrier, S., 2020. Branched and dendritic polymer architectures: Functional nanomaterials for therapeutic delivery, *Advanced Functional Materials*, 30, 2, 1901001.
- Corrado, C., Raimondo, S., Chiesi, A., Ciccia, F., De Leo, G. ve Alessandro, R., 2013. Exosomes as intercellular signaling organelles involved in health and disease: basic science and clinical applications, *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 3, 5338-5366.

- Cosert, K. M., Castro-Forero, A., Steidl, R. J., Worden, R. M. ve Reguera, G., 2019. Bottom-up fabrication of protein nanowires via controlled self-assembly of recombinant *Geobacter pilins*, *MBio*, 10, 6, 10-1128.
- Cui, H., Muraoka, T., Cheetham, A. G. ve Stupp, S. I., 2009. Self-assembly of giant peptide nanobelts, *Nano Letters*, 9, 3, 945-951.
- Cui, J., Liu, A., Guan, Y., Zheng, J., Shen, Z. ve Wan, X., 2010. Tuning the helicity of self-assembled structure of a sugar-based organogelator by the proper choice of cooling rate, *Langmuir*, 26, 5, 3615-3622.
- Cui, S., Cheng, Z., Qin, W. ve Jiang, L., 2018. Exosomes as a liquid biopsy for lung cancer, *Lung Cancer*, 116, 46-54.
- Danesh, A., Inglis, H. C., Jackman, R. P., Wu, S., Deng, X., Muench, M. O., Heitman, J. W. ve Norris, P. J., 2014. Exosomes from red blood cell units bind to monocytes and induce proinflammatory cytokines, boosting T-cell responses *in vitro* blood, *The Journal of the American Society of Hematology*, 123, 5, 687-696.
- Das, P., Yuran, S., Yan, J., Lee, P. S. ve Reches, M., 2015. Sticky tubes and magnetic hydrogels co-assembled by a short peptide and melanin-like nanoparticles, *Chemical Communications*, 51, 25, 5432-5435.
- Decuzzi, P., Godin, B., Tanaka, T., Lee, S. Y., Chiappini, C., Liu, X. ve Ferrari, M. J. J. O. C. R., 2010. Size and shape effects in the biodistribution of intravascularly injected particles, *Journal of Controlled Release*, 141, 3, 320-327.
- Demirel, G., Malvadkar, N. ve Demirel, M. C., 2010. Control of Protein Adsorption onto Core-Shell Tubular and Vesicular Structures of Diphenylalanine/Parylene, *Langmuir*, 26, 3, 1460-1463.
- Deregibus, M. C., Figliolini, F., D'antico, S., Manzini, P. M., Pasquino, C., De Lena, M., Tetta, C., Brizzi, M. F. ve Camussi, G., 2016. Charge-based precipitation of extracellular vesicles, *International Journal of Molecular Medicine*, 38, 5, 1359-1366.
- De Toro, J., Herschlik, L., Waldner, C. ve Mongini, C., 2015. Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions: new insights for diagnosis and therapeutic applications, *Frontiers in Immunology*, 6, 129468.
- Development of L-asparaginase biobetters: current research status and review of the desirable quality profiles, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6, 212.
- Diepstraten, S. T., Anderson, M. A., Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A. ve Kelly, G. L., 2022. The manipulation of apoptosis for cancer therapy using BH3-mimetic drugs, *Nature Reviews Cancer*, 22, 1, 45-64.

- Dikici, E., Acet, B. Ö., Gök, T., Acet, Ö. ve Odabaşı, M., 2023. Self-Assembled Short Peptide Nanostructures: "Dipeptides", MANAS Journal of Engineering, 11, 1, 83-91.
- Dilnawaz, F., Singh, A., Mohanty, C. ve Sahoo, S. K., 2010. Dual drug loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeted cancer therapy, Biomaterials, 31, 13, 3694-3706.
- Edlich, F., 2018. BCL-2 proteins and apoptosis: Recent insights and unknowns, Biochemical and Biophysical Research Communications, 500, 1, 26-34.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. ve Tuschl, T., 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, Nature, 411, 6836, 494-498.
- Eon-Duval, A., Broly, H. ve Gleixner, R., 2012. Quality attributes of recombinant therapeutic proteins: an assessment of impact on safety and efficacy as part of a quality by design development approach, Biotechnology Progress, 28, 3, 608-622.
- Ersöz, E., Can, O. B. ve Uzunoğlu, S., 2016. Eksozomların kanserdeki rolü, Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 3, 1, 144-152.
- Fan, T., Yu, X., Shen, B. ve Sun, L., 2017. Peptide self-assembled nanostructures for drug delivery applications, Journal of Nanomaterials, 2017.
- Fan, Z., Fu, P. P., Yu, H. ve Ray, P. C., 2014. Theranostic nanomedicine for cancer detection and treatment, Journal of Food and Drug Analysis, 22 1, 3-17.
- Fong, W. K., Moore, T. L., Balog, S., Vanhecke, D., Rodriguez-Lorenzo, L., Rothen-Rutishauser, B., Lattuada, M. ve Petri-Fink, A., 2019. Nanoparticle behaviour in complex media: methods for characterizing physicochemical properties, evaluating protein corona formation, and implications for biological studies, Biological Responses to Nanoscale Particles: Molecular and Cellular Aspects and Methodological Approaches, 101-150.
- Gallart-Palau, X., Serra, A. ve Sze, S. K., 2016. Enrichment of extracellular vesicles from tissues of the central nervous system by PROSPR, Molecular Neurodegeneration, 11, 1-13.
- Gazit, E., 2007. Self-assembled peptide nanostructures: the design of molecular building blocks and their technological utilization, Chemical Society Reviews, 36, 8, 1263-1269.
- Ghosh, A., Haverick, M., Stump, K., Yang, X., Tweedle, M. F. ve Goldberger, J. E., 2012. Fine-tuning the pH trigger of self-assembly, Journal of the American Chemical Society, 134 8, 3647-3650.

- Giorgi, C., Baldassari, F., Bononi, A., Bonora, M., De Marchi, E., Marchi, S., Missiroli, S., Patergnani, S., Rimessi, A., Suski, J. M., Wieckowski, M. R. ve Pinton, P., 2012, Mitochondrial Ca^{2+} and apoptosis, *Cell Calcium*, 52, 1, 36-43.
- Gonsalves, W. I., Buadi, F. K. ve Kumar, S. K., 2018. Combination therapy incorporating Bcl-2 inhibition with Venetoclax for the treatment of refractory primary plasma cell leukemia with t (11; 14), *European Journal of Haematology*, 100, 2, 215-217.
- Görbitz, C. H., 2003. Nanotubes from hydrophobic dipeptides: pore size regulation through side chain substitution, *New Journal of Chemistry*, 27, 12, 1789-1793.
- Görbitz, C. H., 2006. The structure of nanotubes formed by diphenylalanine, the core recognition motif of Alzheimer's β -amyloid polypeptide *Chemical Communications*, 22, 2332-2334.
- Gregory, J., 1981. Approximate expressions for retarded van der Waals interaction, *Journal of Colloid and Interface Science*, 83, 1, 138-145.
- Guo, J., Lao, Y. ve Chang, D. C., 2009. Calcium and apoptosis. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*, Springer, Boston, USA.
- Gupta, S., Rawat, S., Arora, V., Kottarath, S. K., Dinda, A. K., Vaishnav, P. K., Nayak, B. ve Mohanty, S., 2018. An improvised one-step sucrose cushion ultracentrifugation method for exosome isolation from culture supernatants of mesenchymal stem cells, *Stem Cell Research & Therapy*, 9, 1-11.
- Hanahan, D., 2022. Hallmarks of cancer: new dimensions, *Cancer Discovery*, 12, 1, 31-46.
- Han, T. H., Oh, J. K., Lee, G. J., Pyun, S. I. ve Kim, S. O., 2010. Hierarchical assembly of diphenylalanine into dendritic nanoarchitectures, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79, 2, 440-445.
- He, C., Hu, Y., Yin, L., Tang, C. ve Yin, C., 2010. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles, *Biomaterials*, 31, 13, 3657-3666.
- Heidarzadeh, M., Zarebkohan, A., Rahbarghazi, R. ve Sokullu, E., 2023. Protein corona and exosomes: new challenges and prospects, *Cell Communication and Signaling*, 21, 1, 64.
- Helwa, I., Cai, J., Drewry, M. D., Zimmerman, A., Dinkins, M. B., Khaled, M. L., Seremwe, M., Dismuke, W. M., Bieberich, E., Stamer, W. D., Hamrick, M. W. ve Liu, Y., 2017. A comparative study of serum exosome isolation using differential ultracentrifugation and three commercial reagents, *PloS One*, 12, 1, e0170628.
- Hoshyar, N., Gray, S., Han, H. ve Bao, G., 2016. The effect of nanoparticle size on *in vivo* pharmacokinetics and cellular interaction, *Nanomedicine*, 11, 6, 673-692.

- Huang, R., Wang, Y., Qi, W., Su, R. ve He, Z., 2014. Temperature-induced reversible self-assembly of diphenylalanine peptide and the structural transition from organogel to crystalline nanowires, *Nanoscale Research Letters*, 9, 1-9.
- Huynh, N. T., Passirani, C., Saulnier, P. ve Benoit, J. P., 2009. Lipid nanocapsules: a new platform for nanomedicine, *International Journal of Pharmaceutics*, 379, 2, 201-209.
- Jayawarna, V., Ali, M., Jowitt, T. A., Miller, A. E., Saiani, A., Gough, J. E. ve Ulijn, R. V., 2006. Nanostructured hydrogels for three-dimensional cell culture through self-assembly of fluorenylmethoxycarbonyl-dipeptides, *Advanced Materials*, 18, 5, 611-614.
- Jella, K. K., Nasti, T. H., Li, Z., Malla, S. R., Buchwald, Z. S. ve Khan, M. K., 2018. Exosomes, their biogenesis and role in inter-cellular communication, tumor microenvironment and cancer immunotherapy, *Vaccines*, 6, 4, 69.
- Jeppesen, D. K., Hvam, M. L., Primdahl-Bengtson, B., Boysen, A. T., Whitehead, B., Dyrskjöt, L., Ørntoft, T. F., Howard, K. A. ve Ostenfeld, M. S., 2014. Comparative analysis of discrete exosome fractions obtained by differential centrifugation, *Journal of Extracellular Vesicles*, 3, 1, 25011.
- Jerker, P., 1990. Amino acid side chain interaction with chelate-liganded crosslinked dextran, agarose and TSK gel. A mini review of recent work, *Journal of Molecular Recognition*, 3, 3, 123-127.
- Ji, H., Erfani, N., Tauro, B. J., Kapp, E. A., Zhu, H. J., Moritz, R. L., Lim, J. W. E. ve Simpson, R. J., 2008. Difference gel electrophoresis analysis of Ras-transformed fibroblast cell-derived exosomes, *Electrophoresis*, 29, 12, 2660-2671.
- Katz, A. K., Glusker, J. P., Beebe, S. A. ve Bock, C. W., 1996. Calcium ion coordination: a comparison with that of beryllium, magnesium, and zinc, *Journal of the American Chemical Society*, 118, 24, 5752-5763.
- Keller, S., Sanderson, M. P., Stoeck, A. ve Altevogt, P., 2006. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function, *Immunology Letters*, 107, 2, 102-108.
- Kim, H., Jang, H., Cho, H., Choi, J., Hwang, K. Y., Choi, Y., Kim, S. H. ve Yang, Y., 2021. Recent advances in exosome-based drug delivery for cancer therapy, *Cancers*, 13, 17, 4435.
- Kim, W., Ly, N. K., He, Y., Li, Y., Yuan, Z. ve Yeo, Y., 2023. Protein corona: Friend or foe? Co-opting serum proteins for nanoparticle delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 192, 114635.
- Kiselev, M. A., IuA, G., Dobretsov, G. E. ve Komarova, M. N., 2001. Size of a human serum albumin molecule in solution, *Biofizika*, 46, 3, 423-427.

- Kiss, B., Skuginna, V., Fleischmann, A., Bell, R. H., Collins, C., Thalmann, G. N. ve Seiler, R., 2015. Bcl-2 predicts response to neoadjuvant chemotherapy and is overexpressed in lymph node metastases of urothelial cancer of the bladder, In *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 33, 4, 166.
- Kokkoli, E., Mardilovich, A., Wedekind, A., Rexeisen, E. L., Garg, A. ve Craig, J. A., 2006. Self-assembly and applications of biomimetic and bioactive peptide-amphiphiles, *Soft Matter*, 2, 12, 1015-1024.
- Kommareddy, S., Shenoy, D. B. ve Amiji, M. M., 2006. Long-circulating polymeric nanoparticles for drug and gene delivery to tumors, pp. 231-242, in: Amiji M. M. (Editor), *Nanotechnology for Cancer Therapy*, Boca Raton, USA.
- Kopp, M., Kollenda, S. ve Epple, M., 2017. Nanoparticle–protein interactions: therapeutic approaches and supramolecular chemistry, *Accounts of Chemical Research*, 50, 6, 1383–1390.
- Korkolopoulou, P., Lazaris, A. C., Konstantinidou, A. E., Kavantzias, N., Patsouris, E., Christodoulou, P., Thomas-Tsagli, E. ve Davaris, P., 2002. Differential expression of bcl-2 family proteins in bladder carcinomas: relationship with apoptotic rate and survival, *European Urology*, 41, 3, 274-283.
- Kotschy, A., Szlavik, Z., Murray, J., Davidson, J., Maragno, A. L., Le Toumelin-Braizat, G., Chanrion, M., Kelly G. L., Gong, J. N., Moujalled, D. M., Bruno, A., Csekei, M., Paczal, A., Szabo, Z. B., Sipos, S., Radics, G., Proszienyak, A., Balint, B., Ondi, L., Blasko, G., Robertson, A., Surgenor, A., Dokurno, P., Chen, I. ve Geneste, O., 2016. The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models, *Nature*, 538, 7626, 477-482.
- Kowal, J., Tkach, M. ve Théry, C., 2014. Biogenesis and secretion of exosomes, *Current Opinion in Cell Biology*, 29, 116-125.
- Kralj, S., Rojnik, M., Romih, R., Jagodič, M., Kos, J. ve Makovec, D., 2012. Effect of surface charge on the cellular uptake of fluorescent magnetic nanoparticles, *Journal of Nanoparticle Research*, 14, 1-14.
- Kretzmann, J. A., Evans, C. W., Moses, C., Sorolla, A., Kretzmann, A. L., Wang, E., Ho, D., Hackett, M. J., Dessauvagie, B. F., Smith, N. M., Redfern, A. D., Waryah, C., Norret, M., Iyer, K. S. ve Blancafort, P., 2019. Tumour suppression by targeted intravenous non-viral CRISPRa using dendritic polymers, *Chemical Science*, 10, 33, 7718-7727.
- KW, Y., 2008. Bcl-2 family proteins and cancer, *Oncogene*, 27, 6398-6406.
- Lane, L. A., Qian, X., Smith, A. M. ve Nie, S., 2015. Physical chemistry of nanomedicine: understanding the complex behaviors of nanoparticles *in vivo*, *Annual Review of Physical Chemistry*, 66, 521-547.

- Lassalle, V. ve Ferreira, M. L., 2007. PLA nano-and microparticles for drug delivery: an overview of the methods of preparation, *Macromolecular Bioscience*, 7, 6, 767-783.
- Lässer, C., Seyed Alikhani, V., Ekström, K., Eldh, M., Torregrosa Paredes, P., Bossios, A., Sjöstrand, M., Gabrielsson, S., Lötval, J. ve Valadi, H., 2011. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages, *Journal of Translational Medicine*, 9, 1-8.
- Latifkar, A., Cerione, R. A. ve Antonyak, M. A., 2018. Probing the mechanisms of extracellular vesicle biogenesis and function in cancer, *Biochemical Society Transactions*, 46, 5, 1137-1146.
- Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst, L. ve Muller, R. N., 2008. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications, *Chemical reviews*, 108, 6, 2064-2110.
- Lee, J. H., Choi, Y. J. ve Lim, Y. B., 2010. Self-assembled filamentous nanostructures for drug/gene delivery applications, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 7, 3, 341-351.
- Lee, Y., El Andaloussi, S. ve Wood, M. J., 2012. Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy, *Human Molecular Genetics*, 21, 25-134.
- Li, H., Wang, Y., Tang, Q., Yin, D., Tang, C., He, E., Zou, L. ve Peng, Q., 2021. The protein corona and its effects on nanoparticle-based drug delivery systems, *Acta Biomaterialia*, 129, 57-72.
- Li, I. ve Nabet, B. Y., 2019. Exosomes in the tumor microenvironment as mediators of cancer therapy resistance, *Molecular Cancer*, 18, 1, 32.
- Li, K., Zhang, Z., Zheng, L., Liu, H., Wei, W., Li, Z., He, Z., Larson, A. C. ve Zhang, G., 2015. Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys peptide-modified PEGylated dendrimer-entrapped gold nanoparticles for targeted computed tomography imaging of breast carcinoma, *Nanomedicine*, 10, 14, 2185-2197.
- Lin, S., Yu, Z., Chen, D., Wang, Z., Miao, J., Li, Q., Zhang, D., Song, J. ve Cui, D., 2020. Progress in microfluidics-based exosome separation and detection technologies for diagnostic applications, *Small*, 16, 9, 1903916.
- Li, P., Kaslan, M., Lee, S. H., Yao, J. ve Gao, Z., 2017. Progress in exosome isolation techniques, *Theranostics*, 7, 3, 789.
- Li, T., Li, X., Han, G., Liang, M., Yang, Z., Zhang, C., Huang, S., Tai, S. ve Yu, S., 2022. The therapeutic potential and clinical significance of exosomes as carriers of drug delivery system, *Pharmaceutics*, 15, 1, 21.

- Li, T., Lu, X. M., Zhang, M. R., Hu, K. ve Li, Z., 2022. Peptide-based nanomaterials: Self-assembly, properties and applications, *Bioactive Materials*, 11, 268-282.
- Liu, J., Chen, Y., Pei, F., Zeng, C., Yao, Y., Liao, W. ve Zhao, Z., 2021. Extracellular vesicles in liquid biopsies: potential for disease diagnosis, *BioMed Research International*, 2021, 1, 6611244.
- Liu, J., Liu, J., Chu, L., Zhang, Y., Xu, H., Kong, D., Yang, Z., Yang, C. ve Ding, D., 2014. Self-assembling peptide of D-amino acids boosts selectivity and antitumor efficacy of 10-hydroxycamptothecin, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 6, 8, 5558-5565.
- Li, X., Zhang, H., Liu, L., Cao, C., Wei, P., Yi, X., Zhou, Y., Lv, Q., Zhou, D. ve Yi, T., 2021. De novo design of self-assembly hydrogels based on Fmoc-diphenylalanine providing drug release, *Journal of Materials Chemistry B*, 9, 41, 8686-8693.
- Li, Y., Gao, G. H. ve Lee, D. S., 2013. Stimulus-sensitive polymeric nanoparticles and their applications as drug and gene carriers, *Advanced Healthcare Materials*, 2, 3, 388-417.
- Li, Y., Li, B., Fu, Y., Lin, S. ve Yang, Y., 2013. Solvent-induced handedness inversion of dipeptide sodium salts derived from alanine, *Langmuir*, 29, 31, 9721-9726.
- Li, Y., Yang, G., Gerstweiler, L., Thang, S. H. ve Zhao, C. X., 2023. Design of stimuli-responsive peptides and proteins, *Advanced Functional Materials*, 33, 7, 2210387.
- Li, Y., Yan, L., Liu, K., Wang, J., Wang, A., Bai, S. ve Yan, X., 2016. Solvothermally mediated self-assembly of ultralong peptide nanobelts capable of optical waveguiding, *Small*, 12, 19, 2575-2579.
- Li, Y., Zheng, T., Du, Y., Zhao, B., Patel, H. P., Boldt, R., Auernhammer, G. K., Fery, A., Li, J. ve Thiele, J., 2024. Titanium dioxide nanoparticles embedded in assembled dipeptide hydrogels for microfluidic photodegradation, *Journal of Colloid and Interface Science*, 654, 405-412.
- Llambi, F. ve Green, D. R., 2011. Apoptosis and oncogenesis: give and take in the BCL-2 family, *Current Opinion in Genetics & Development*, 21, 1, 12-20.
- Lobb, R. J., Becker, M., Wen Wen, S., Wong, C. S., Wiegmanns, A. P., Leimgruber, A. ve Möller, A., 2015. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma, *Journal of Extracellular Vesicles*, 4, 1, 27031.
- Lohcharoenkal, W., Wang, L., Chen, Y. C. ve Rojanasakul, Y., 2014. Protein nanoparticles as drug delivery carriers for cancer therapy, *BioMed Research International*, 2014, 1, 180549.
- Luo, Z., Zhao, X. ve Zhang, S., 2008. Structural dynamic of a self-assembling peptide d-EAK16 made of only D-amino acids, *PloS One*, 3, 5, e2364.

- Mahmoudi, M., Lynch, I., Ejtehad, M. R., Monopoli, M. P., Bombelli, F. B. ve Laurent, S., 2011. Protein– nanoparticle interactions: opportunities and challenges, *Chemical Reviews*, 111, 9, 5610–5637.
- Maksoudian, C., Saffarzadeh, N., Hesemans, E., Dekoning, N., Buttiens, K. ve Soenen, S. J., 2020. Role of inorganic nanoparticle degradation in cancer therapy, *Nanoscale Advances*, 2, 9, 3734-3763.
- Ma, M., Zhong, J., Li, W., Zhou, J., Yan, Z., Ding, J. ve He, D., 2013. Comparison of four synthetic model peptides to understand the role of modular motifs in the self-assembly of silk fibroin, *Soft Matter*, 9, 47, 11325-11333.
- Mandler, D. ve Kraus-Ophir, S., 2011. Self-assembled monolayers (SAMs) for electrochemical sensing, *Journal of Solid-State Electrochemistry*, 15, 7-8, 1535.
- Mason, T. O., Chirgadze, D. Y., Levin, A., Adler-Abramovich, L., Gazit, E., Knowles, T. P. ve Buell, A. K., 2014. Expanding the solvent chemical space for self-assembly of dipeptide nanostructures, *ACS Nano*, 8, 2, 1243-1253.
- Martinou, J. C. ve Youle, R. J., 2011. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics, *Developmental Cell*, 21, 1, 92-101.
- Mathivanan, S., Fahner, C. J., Reid, G. E. ve Simpson, R. J., 2012. ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids, *Nucleic Acids Research*, 40, 1241-1244.
- Mathivanan, S., Lim, J. W., Tauro, B. J., Ji, H., Moritz, R. L. ve Simpson, R. J., 2010. Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature, *Molecular & Cellular Proteomics*, 9, 2, 197-208.
- Mathivanan, S. ve Simpson, R. J., 2009. ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA, *Proteomics*, 9, 21, 4997-5000.
- Matson, J. B., Zha, R. H. ve Stupp, S. I., 2011. Peptide self-assembly for crafting functional biological materials, *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 15, 6, 225-235.
- Margolis, L. ve Sadovsky, Y., 2019. The biology of extracellular vesicles: The known unknowns, *PLoS Biology*, 17, 7, e3000363.
- McKinnon, K. M., 2018. Flow cytometry: an overview, *Current Protocols in Immunology*, 120, 1, 5-1.
- Mech, A., Wohlleben, W., Ghanem, A., Hodoroaba, V. D., Weigel, S., Babick, F., Brüngel, R., Friedrich, C. M., Rasmussen, K. ve Rauscher, H., 2020. Nano or not nano? A structured approach for identifying nanomaterials according to the European Commission’s Definition, *Small*, 16, 36, 2002228.

- Midekessa, G., Godakumara, K., Ord, J., Viil, J., Lättekivi, F., Dissanayake, K., Kopanchuk, S., Rinken, A., Andronowska, A., Bhattacharjee, S., Rinken, T. ve Fazeli, A., 2020. Zeta potential of extracellular vesicles: toward understanding the attributes that determine colloidal stability, *ACS Omega*, 5, 27, 16701-16710.
- Mirshafiee, V., Kim, R., Mahmoudi, M. ve Kraft, M. L., 2016. The importance of selecting a proper biological milieu for protein corona analysis *in vitro*: Human plasma versus human serum, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 75, 188-195.
- Mitchell, M. J., Billingsley, M. M., Haley, R. M., Wechsler, M. E., Peppas, N. A. ve Langer, R., 2021. Engineering precision nanoparticles for drug delivery, *Nature Reviews Drug Discovery*, 20, 2, 101-124.
- M Leite, D., Barbu, E., J Pilkington, G. ve Lalatsa, A., 2015. Peptide self-assemblies for drug delivery, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 15, 22, 2277-2289.
- Mohanty, A. ve Park, I. K., 2023. Protein-Caged Nanoparticles: A Promising Nanomedicine Against Cancer, *Chonnam Medical Journal*, 59, 1, 1.
- Monopoli, M. P., Aberg, C., Salvati, A. ve Dawson, K. A., 2020. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials, *Nano-Enabled Medical Applications*, 7,12, 205-229.
- Monopoli, M. P., Walczyk, D., Campbell, A., Elia, G., Lynch, I., Baldelli Bombelli, F. ve Dawson, K. A., 2011. Physical– chemical aspects of protein corona: relevance to *in vitro* and *in vivo* biological impacts of nanoparticles, *Journal of the American Chemical Society*, 133, 8, 2525-2534.
- Moore, T. L., Rodriguez-Lorenzo, L., Hirsch, V., Balog, S., Urban, D., Jud, C., Rothen-Rutishauser, B., Lattuada, M. ve Petri-Fink, A., 2015. Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions, *Chemical Society Reviews*, 44, 17, 6287-6305.
- Munro, C. J. ve Knecht, M. R., 2018. Applications and advancements of peptides in the design of metallic nanomaterials, *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 12, 63-68.
- Mura, S., Nicolas, J. ve Couvreur, P., 2013. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery, *Nature Materials*, 12, 11, 991-1003.
- Mu, R., Zhu, D., Abdulmalik, S., Wijekoon, S., Wei, G. ve Kumbar, S. G., 2024. Stimuli-responsive peptide assemblies: Design, self-assembly, modulation, and biomedical applications, *Bioactive Materials*, 35, 181-207.
- Naito, Y., Yoshioka, Y., Yamamoto, Y. ve Ochiya, T., 2017. How cancer cells dictate their microenvironment: present roles of extracellular vesicles, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74, 697-713.

- Nam, J., Won, N., Jin, H., Chung, H. ve Kim, S., 2009. pH-induced aggregation of gold nanoparticles for photothermal cancer therapy, *Journal of the American Chemical Society*, 131, 38, 13639-13645.
- Nazarenus, M., Zhang, Q., Soliman, M. G., Del Pino, P., Pelaz, B., Carregal-Romero, S., Rejman, J., Rothen-Rutishauser, B., Clift, M. J. D., Zellner, R., Nienhaus, G. U., Delehanty, J. B., Medintz, I. L. ve Parak, W. J., 2014. *In vitro* interaction of colloidal nanoparticles with mammalian cells: What have we learned thus far?, *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 5, 1, 1477-1490.
- Nazemi, M. ve Rainero, E., 2020. Cross-talk between the tumor microenvironment, extracellular matrix, and cell metabolism in cancer, *Frontiers in Oncology*, 10, 239.
- Nel, A. E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E. M., Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V. ve Thompson, M., 2009. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface, *Nature Materials*, 8, 7, 543-557.
- Nikam, R. R. ve Gore, K. R., 2018. Journey of siRNA: clinical developments and targeted delivery, *Nucleic Acid Therapeutics*, 28, 4, 209-224.
- O'Grady, S. ve Morgan, M. P., 2021. Calcium transport and signalling in breast cancer: Functional and prognostic significance, In *Seminars in Cancer Biology*, 72, 19-26.
- Okesola, B. O. ve Mata, A., 2018. Multicomponent self-assembly as a tool to harness new properties from peptides and proteins in material design, *Chemical Society Reviews*, 47, 10, 3721-3736.
- Oksel Karakus, C., Bilgi, E. ve Winkler, D. A., 2021. Biomedical nanomaterials: applications, toxicological concerns, and regulatory needs, *Nanotoxicology*, 15, 3, 331-351.
- Oltersdorf, T., Elmore, S. W., Shoemaker, A. R., Armstrong, R. C., Augeri, D. J., Belli, B. A., Bruncko, M., Deckwerth, T. L., Dinges, J., Hajduk, P. J., Joseph, M. K., Kitada, S., Korsmeyer, S. J., Kunzer, A. R., Letai, A., Li, C., Mitten, M. J., Nettesheim, D. G., Ng, S., Nimmer, P. M., O'Connor, J. M., Oleksijew, A., Petros, A. M., Reed, J. C., Shen, W., Tahir, S. K., Thompson, C. B., Tomaselli, K. J., Wang, B., Wendt, M. D., Zhang, H., Fesik, S. W. ve Rosenberg, S. H., 2005. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours, *Nature*, 435, 7042, 677-681.
- Onur, T., Yuca, E., Olmez, T. T. ve Seker, U. O. S., 2018. Self-assembly of bacterial amyloid protein nanomaterials on solid surfaces, *Journal of Colloid and Interface Science*, 520, 145-154.
- Orrenius, S. ve Nicotera, P., 1994. The calcium ion and cell death, *Journal of Neural Transmission, Supplementum*, 43, 1-11.

- Panariti, A., Misericocchi, G. ve Rivolta, I., 2012. The effect of nanoparticle uptake on cellular behavior: disrupting or enabling functions?, *Nanotechnology, Science and Applications*, 5, 87-100.
- Pan, B. T. ve Johnstone, R. M., 1983. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes *in vitro*: selective externalization of the receptor, *Cell*, 33, 3, 967-978.
- Panda, J. J. ve Chauhan, V. S., 2014. Short peptide based self-assembled nanostructures: implications in drug delivery and tissue engineering, *Polymer Chemistry*, 5, 15, 4418-4436.
- Pandit, G., Roy, K., Agarwal, U. ve Chatterjee, S., 2018. Self-assembly mechanism of a peptide-based drug delivery vehicle, *ACS Omega*, 3, 3, 3143-3155.
- Paolini, L., Zendrini, A., Noto, G. D., Busatto, S., Lottini, E., Radeghieri, A., Dossi, A., Caneschi, A., Ricotta, D. ve Bergese, P., 2016. Residual matrix from different separation techniques impacts exosome biological activity, *Scientific Reports*, 6, 1, 23550.
- Park, S. J., 2020. Protein–nanoparticle interaction: corona formation and conformational changes in proteins on nanoparticles, *International Journal of Nanomedicine*, 5783-5802.
- Patel, K. D., Mohid, S. A., Dutta, A., Arichthota, S., Bhunia, A., Haldar, D. ve Sarojini, V., 2021. Synthesis and antibacterial study of cell-penetrating peptide conjugated trifluoroacetyl and thioacetyl lysine modified peptides, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 219, 113447.
- Pearce, A. K., Wilks, T. R., Arno, M. C. ve O'Reilly, R. K., 2021. Synthesis and applications of anisotropic nanoparticles with precisely defined dimensions, *Nature Reviews Chemistry*, 5, 1, 21-45.
- Pernot, S., Evrard, S. ve Khatib, A. M., 2022. The give-and-take interaction between the tumor microenvironment and immune cells regulating tumor progression and repression, *Frontiers in Immunology*, 13, 850856.
- Perween, S., Chandanshive, B., Kotamarthi, H. C. ve Khushalani D., 2013. Single amino acid based self-assembled structure, *Soft Matter*, 9, 42, 10141–10145.
- Prokop, A. ve Davidson, J. M., 2008. Nanovehicular intracellular delivery systems, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97, 9, 3518-3590.
- Pugazhendhi, A., Edison, T. N. J. I., Karuppusamy, I. ve Kathirvel, B., 2018. Inorganic nanoparticles: a potential cancer therapy for human welfare, *International Journal of Pharmaceutics*, 539, 1-2, 104-111.

- Pujals, S., Fernández-Carneado, J., López-Iglesias, C., Kogan, M. J. ve Giralt, E., 2006. Mechanistic aspects of CPP-mediated intracellular drug delivery: relevance of CPP self-assembly, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758, 3, 264-279.
- Purwada, A., Tian, Y. F., Huang, W., Rohrbach, K. M., Deol, S., August, A. ve Singh, A., 2016. Self-assembly protein nanogels for safer cancer immunotherapy, *Advanced Healthcare Materials*, 5, 12, 1413.
- Qi, C., Lin, J., Fu, L. H. ve Huang, P., 2018. Calcium-based biomaterials for diagnosis, treatment, and theranostics, *Chemical Society Reviews*, 47, 2, 357-403.
- Rangan, S. R. S., 1972. A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma, *Cancer*, 29, 1, 117-121.
- Rao, C. N. R., Müller, A. ve Cheetham, A. K., 2004. Nanomaterials—an introduction, *The Chemistry of Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications*, 1-11.
- Zhang, Z., Cao, X., Wang, C., Huang, Q., Liu, Y., 2024. Nanomaterials in cancer treatment, in: Imran, M. M., Shah, M.R., Hussain D., Guo, D. S. (Editor), *Handbook of Nanomaterials*, Volume 2. Elsevier, USA.
- Reches, M. ve Gazit, E., 2003. Casting metal nanowires within discrete self-assembled peptide nanotubes, *Science*, 300, 5619, 625-627.
- Reches, M. ve Gazit, E., 2006. Controlled patterning of aligned self-assembled peptide nanotubes, *Nature Nanotechnology*, 1, 3, 195-200.
- Ren, H., Wu, L., Tan, L., Bao, Y., Ma, Y., Jin, Y. ve Zou, Q., 2021. Self-assembly of amino acids toward functional biomaterials, *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 12, 1, 1140-1150.
- Rodriguez-Quijada, C., Sánchez-Purrà, M., de Puig, H. ve Hamad-Schifferli, K., 2018. Physical properties of biomolecules at the nanomaterial interface, *The Journal of Physical Chemistry B*, 122, 11, 2827-2840.
- Rubert Pérez, C. M., Stephanopoulos, N., Sur, S., Lee, S. S., Newcomb, C. ve Stupp, S. I., 2015. The powerful functions of peptide-based bioactive matrices for regenerative medicine, *Annals of Biomedical Engineering*, 43, 501-514.
- Ruivo, C. F., Adem, B., Silva, M. ve Melo, S. A., 2017. The biology of cancer exosomes: insights and new perspectives, *Cancer Research*, 77, 23, 6480-6488.
- Ryu, K. J., Lee, J. Y., Park, C., Cho, D. ve Kim, S. J., 2020. Isolation of small extracellular vesicles from human serum using a combination of ultracentrifugation with polymer-based precipitation, *Annals of Laboratory Medicine*, 40, 3, 253.

- Saada, M. C., Montero, J. L., Vullo, D., Scozzafava, A., Winum, J. Y. ve Supuran, C. T., 2011. Carbonic anhydrase activators: gold nanoparticles coated with derivatized histamine, histidine, and carnosine show enhanced activatory effects on several mammalian isoforms, *Journal of Medicinal Chemistry*, 54, 5, 1170-1177.
- Sacks, L. V., Shamsuddin, H. H., Yasinskaya, Y. I., Bouri, K., Lanthier, M. L. ve Sherman, R. E., 2014. Scientific and regulatory reasons for delay and denial of FDA approval of initial applications for new drugs, 2000-2012. *Jama*, 311, 4, 378-384.
- Saengkrit, N., Saesoo, S., Srinuanchai, W., Phunpee, S. ve Ruktanonchai, U. R., 2014. Influence of curcumin-loaded cationic liposome on anticancer activity for cervical cancer therapy, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 114, 349-356.
- Schuster, D., Laggner, C. ve Langer, T., 2005. Why drugs fail-a study on side effects in new chemical entities, *Current Pharmaceutical Design*, 11, 27, 3545-3559.
- Schweiger, C., Hartmann, R., Zhang, F., Parak, W. J., Kissel, T. H. ve Rivera_Gil, P., 2012. Quantification of the internalization patterns of superparamagnetic iron oxide nanoparticles with opposite charge, *Journal of Nanobiotechnology*, 10, 1, 1-11.
- Shafey, A. M. E., 2020. Green synthesis of metal and metal oxide nanoparticles from plant leaf extracts and their applications: A review, *Green Processing and Synthesis*, 9, 1, 304-339.
- Shah, R., Patel, T. ve Freedman, J. E., 2018. Circulating extracellular vesicles in human disease, *New England Journal of Medicine*, 379, 10, 958-966.
- Shen, J., Zhang, W., Qi, R., Mao, Z. W. ve Shen, H., 2018. Engineering functional inorganic-organic hybrid systems: advances in siRNA therapeutics, *Chemical Society Reviews*, 47, 6, 1969-1995.
- Shin, W. K., Cho, J., Kannan, A. G., Lee, Y. S. ve Kim, D. W., 2016. Cross-linked composite gel polymer electrolyte using mesoporous methacrylate-functionalized SiO₂ nanoparticles for lithium-ion polymer batteries, *Scientific Reports*, 6, 1, 26332.
- Siemer, S., Fauth, T., Scholz, P., Al-Zamel, Y., Khamis, A., Gül, D., Freudelsperger, L., Wollenberg, B., Becker, S., Stauber, R. H. ve Hagemann, J., 2021. Profiling cisplatin resistance in head and neck cancer: A critical role of the VRAC ion channel for chemoresistance, *Cancers*, 13, 19, 4831.
- Silva, R. F., Araújo, D. R., Silva, E. R., Ando, R. A. ve Alves, W. A., 2013. L-diphenylalanine microtubes as a potential drug-delivery system: characterization, release kinetics, and cytotoxicity, *Langmuir*, 29, 32, 10205-10212.

- Smith, K. H., Tejeda-Montes, E., Poch, M. ve Mata, A., 2011. Integrating top-down and self-assembly in the fabrication of peptide and protein-based biomedical materials, *Chemical Society Reviews*, 40, 9, 4563-4577.
- Soares Martins, T., Catita, J., Martins Rosa, I., AB da Cruz e Silva, O. ve Henriques, A. G., 2018. Exosome isolation from distinct biofluids using precipitation and column-based approaches, *PloS One*, 13, 6, e0198820.
- Song, S., Qin, Y., He, Y., Huang, Q., Fan, C. ve Chen, H. Y., 2010. Functional nanoprobe for ultrasensitive detection of biomolecules, *Chemical Society Reviews*, 39, 11, 4234-4243.
- Stephanopoulos, N., Ortony, J. H. ve Stupp, S. I., 2013. Self-assembly for the synthesis of functional biomaterials, *Acta Materialia*, 61, 3, 912-930.
- Stupp, S. I., 2010. Self-assembly and biomaterials, *Nano Letters*, 10, 12, 4783-4786.
- Su, D., Gao, L., Gao, F., Zhang, X. ve Gao, X., 2020. Peptide and protein modified metal clusters for cancer diagnostics, *Chemical Science*, 11, 22, 5614-5629.
- Sukumaran, P., Nascimento Da Conceicao, V., Sun, Y., Ahamad, N., Saraiva, L. R., Selvaraj, S. ve Singh, B. B., 2021. Calcium signaling regulates autophagy and apoptosis, *Cells*, 10, 8, 2125.
- Sun, B., Chang, R., Cao, S., Yuan, C., Zhao, L., Yang, H., Li, J., Yan, X. ve van Hest, J. C., 2020. Acid-activatable transmorphing peptide-based nanomaterials for photodynamic therapy, *Angewandte Chemie*, 132, 46, 20763-20769.
- Sun, L., Yi, S., Wang, Y., Pan, K., Zhong, Q. ve Zhang, M., 2013. A bio-inspired approach for in situ synthesis of tunable adhesive, *Bioinspiration & Biomimetics*, 9, 1, 016005.
- Tagalakakis, A. D., Maeshima, R., Yu-Wai-Man, C., Meng, J., Syed, F., Wu, L. P., Aldossary, A. M., McCarthy, D., Moghimi, S. M. ve Hart, S. L., 2017. Peptide and nucleic acid-directed self-assembly of cationic nanovehicles through giant unilamellar vesicle modification: targetable nanocomplexes for *in vivo* nucleic acid delivery, *Acta Biomaterialia*, 51, 351-362.
- Tarasov, V. V., Svistunov, A. A., Chubarev, V. N., Dostdar, S. A., Sokolov, A. V., Brzecka, A., Sukocheva, O., Neganova, M. E., Klochkov, S. G., Somasundaram, S. G., Kirkland, C. E. ve Aliev, G., 2021. Extracellular vesicles in cancer nanomedicine, In *Seminars in Cancer Biology*, 69, 212-225.
- Tauro, B. J., Greening, D. W., Mathias, R. A., Ji, H., Mathivanan, S., Scott, A. M. ve Simpson, R. J., 2012. Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes, *Methods*, 56, 2, 293-304.

- Tavasolian, F., Hosseini, A. Z., Soudi, S. ve Naderi, M., 2020. miRNA-146a improves immunomodulatory effects of MSC-derived exosomes in rheumatoid arthritis, *Current Gene Therapy*, 20, 4, 297-312.
- Tesauro, D., Accardo, A., Diaferia, C., Milano, V., Guillon, J., Ronga, L. ve Rossi, F., 2019. Peptide-based drug-delivery systems in biotechnological applications: recent advances and perspectives, *Molecules*, 24, 2, 351.
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G. ve Clayton, A., 2006. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids, *Current Protocols in Cell Biology*, 30, 1, 3-22.
- Théry, C., Boussac, M., Véron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J. ve Amigorena, S., 2001. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles, *The Journal of Immunology*, 166, 12, 7309-7318.
- Théry, C., Zitvogel, L. ve Amigorena, S., 2002. Exosomes: composition, biogenesis and function, *Nature Reviews Immunology*, 2, 8, 569-579.
- Tiwari, J. N., Tiwari, R. N. ve Kim, K. S., 2012. Zero-dimensional, one-dimensional, two-dimensional and three-dimensional nanostructured materials for advanced electrochemical energy devices, *Progress in Materials Science*, 57, 4, 724-803.
- Toksoz, S., Acar, H. ve Guler, M. O., 2010. Self-assembled one-dimensional soft nanostructures, *Soft Matter*, 6, 23, 5839-5849.
- Tong, W. Y., Alnakhli, M., Bhardwaj, R., Apostolou, S., Sinha, S., Fraser, C., Kuchel, T., Kuss, B. ve Voelcker, N. H., 2018. Delivery of siRNA *in vitro* and *in vivo* using PEI-capped porous silicon nanoparticles to silence MRP1 and inhibit proliferation in glioblastoma, *Journal of Nanobiotechnology*, 16, 1-17.
- Tóth, E. Á., Turiák, L., Visnovitz, T., Cserép, C., Mázló, A., Sódar, B. W., Försönits, A. I., Petővári, G., Sebestyén, A., Komlósi, Z., Drahos, L., Kittel, Á., Nagy, G., Bácsi, A., Dénes, Á., Gho, Y. S., Taylor, K. E. S. ve Buzás, E. I., 2021. Formation of a protein corona on the surface of extracellular vesicles in blood plasma, *Journal of Extracellular Vesicles*, 10, 11, e12140.
- Tron, A. E., Belmonte, M. A., Adam, A., Aquila, B. M., Boise, L. H., Chiarparin, E., Cidado, J., Embrey, K. J., Gangl, E., Gibbons, F. D., Gregory G. P., Hargreaves, D., Hendricks, J. A., Johannes, R. W., Johnstone, R. W., Kazmirski, S. L., Kettle, J. G., Lamb, M. L., Matulis, S. M., Nooka, A. K., Packer, M. J., Peng, B., Rawlins, P. B., Robbins, D. W., Schuller, A. G., Su, N., Yang, W., Ye, Q., Zheng, X., Secrist, J. P., Clark, E. A., Wilson, D. M., Fawell S. E. ve Hird, A. W., 2018. Discovery of Mcl-1-specific inhibitor AZD5991 and preclinical activity in multiple myeloma and acute myeloid leukemia, *Nature Communications*, 9, 1, 5341.

- Van der Pol, E., Böing, A. N., Harrison, P., Sturk, A. ve Nieuwland, R., 2012. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles, *Pharmacological Reviews*, 64, 3, 676-705.
- Van Norman, G. A., 2016. Drugs, devices, and the FDA: part 1: an overview of approval processes for drugs, *JACC: Basic to Translational Science*, 1, 3, 170-179.
- Veiga, A. S., Sinthuvanich, C., Gaspar, D., Franquelim, H. G., Castanho, M. A. ve Schneider, J. P., 2012. Arginine-rich self-assembling peptides as potent antibacterial gels, *Biomaterials*, 33, 35, 8907-8916.
- Vence, M. G., del Pilar Chantada-Vazquez, M., Vazquez-Estevez, S., Cameselle-Teijeiro, J. M., Bravo, S. B. ve Nunez, C., 2020. Potential clinical applications of the personalized, disease-specific protein corona on nanoparticles, *Clinica Chimica Acta*, 501, 102-111.
- Verma, A. ve Stellacci, F., 2010. Effect of surface properties on nanoparticle–cell interactions, *Small*, 6, 1, 12-21.
- Vistica, D. T., Skehan, P., Scudiero, D., Monks, A., Pittman, A. ve Boyd, M. R., 1991. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production, *Cancer Research*, 51, 10, 2515-2520.
- Wang, L., Gong, C., Yuan, X. ve Wei, G., 2019. Controlling the self-assembly of biomolecules into functional nanomaterials through internal interactions and external stimulations: A review, *Nanomaterials*, 9, 2, 285.
- Wang, M., Du, L., Wu, X., Xiong, S. ve Chu, P. K., 2011. Charged diphenylalanine nanotubes and controlled hierarchical self-assembly, *Acs Nano*, 5, 6, 4448-4454.
- Wang, M., Yang, Q., Li, M., Zou, H., Wang, Z., Ran, H., Zheng, Y., Jian, J., Zhou, Y., Luo, Y., Ran, Y., Jiang, S. ve Zhou, X., 2020. Multifunctional nanoparticles for multimodal imaging-guided low-intensity focused ultrasound/immunosynergistic retinoblastoma therapy, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 12, 5, 5642-5657.
- Wang, Q., Xue, Y., Zhang, L., Zhong, Z., Feng, S., Wang, C., Xiao, L., Yang, Z., Harris J. K., Wu, Z., Zhai, J., Yang, M., Li, S., Jacobsen, S. E. ve Du, J., 2021. Mechanism of siRNA production by a plant Dicer-RNA complex in dicing-competent conformation, *Science*, 374, 6571, 1152-1157.
- Wang, S., Zhang, J., Zhou, H., Lu, Y. C., Jin, X., Luo, L. ve You, J., 2023. The role of protein corona on nanodrugs for organ-targeting and its prospects of application, *Journal of Controlled Release*, 360, 15-43.
- Wang, Y., Cai, R. ve Chen, C., 2019. The nano–bio interactions of nanomedicines: Understanding the biochemical driving forces and redox reactions, *Accounts of Chemical Research*, 52, 6, 1507-1518.

- Wang, Y. ve Gong, X., 2017. Special oleophobic and hydrophilic surfaces: approaches, mechanisms, and applications, *Journal of Materials Chemistry A*, 5 8, 3759-3773.
- Wang, Z., Gao, H., Zhang, Y., Liu, G., Niu, G. ve Chen, X., 2017. Functional ferritin nanoparticles for biomedical applications, *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 11, 633-646.
- Wang, Z., Li, Y., Huang, Y., Thompson, M. P., LeGuyader, C. L., Sahu, S. ve Gianneschi, N. C., 2015. Enzyme-regulated topology of a cyclic peptide brush polymer for tuning assembly, *Chemical Communications*, 51, 96, 17108-17111.
- Weyhenmeyer, B., Murphy, A. C., Prehn, J. H. M. ve Murphy, B. M., 2012. Targeting the anti-apoptotic Bcl-2 family members for the treatment of cancer, *Experimental Oncology*.
- Whitehead, K. A., Langer, R. ve Anderson, D. G., 2009. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery, *Nature Reviews Drug Discovery*, 8, 2, 129-138.
- Whitesides, G. M., Mathias, J. P. ve Seto, C. T., 1991. Molecular self-assembly and nanochemistry: a chemical strategy for the synthesis of nanostructures, *Science*, 254, 5036, 1312-1319.
- Whitesides, G. M. ve Grzybowski, B., 2002. Self-assembly at all scales, *Science*, 295, 5564, 2418-2421.
- Whitford, W. ve Guterstam, P., 2019. Exosome manufacturing status, *Future Medicinal Chemistry*, 11, 10, 1225-1236.
- Williams, D. S., Pijpers, I. A., Ridolfo, R. ve van Hest, J. C., 2017. Controlling the morphology of copolymeric vectors for next generation nanomedicine, *Journal of Controlled Release*, 259, 29-39.
- Wu, W., Pu, Y. ve Shi, J., 2022. Nanomedicine-enabled chemotherapy-based synergetic cancer treatments, *Journal of Nanobiotechnology*, 20, 1, 4.
- Xiang, Y., Liu, C., Ma, S., Wang, X., Zhu, L. ve Bao, C., 2023. Stimuli-Responsive Peptide Self-Assembly to Construct Hydrogels with Actuation and Shape Memory Behaviors, *Advanced Functional Materials*, 33, 34, 2300416.
- Xu, R., Rai, A., Chen, M., Suwakulsiri, W., Greening, D. W. ve Simpson, R. J., 2018. Extracellular vesicles in cancer—implications for future improvements in cancer care, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 15, 10, 617-638.
- Xu, W. C., Qian, G., Liu, A. Q., Li, Y. Q. ve Zou, H. Q., 2018. Urinary extracellular vesicle: a potential source of early diagnostic and therapeutic biomarker in diabetic kidney disease, *Chinese Medical Journal*, 131, 11, 1357-1364.

- Yang, D., Zhang, W., Zhang, H., Zhang, F., Chen, L., Ma, L., Larcher, L. M., Chen, S., Liu, N., Zhao, Q., Tran, P. H. L., Chen, C., Veedu, R. N. ve Wang, T., 2020. Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation-efforts for efficient exosome-based theranostics, *Theranostics*, 10, 8, 3684.
- Yang, M. ve Wu, S. Y., 2018. The advances and challenges in utilizing exosomes for delivering cancer therapeutics, *Frontiers in Pharmacology*, 9, 383107.
- Yang, M., Wu, E., Tang, W., Qian, J. ve Zhan, C., 2021. Interplay between nanomedicine and protein corona, *Journal of Materials Chemistry B*, 9, 34, 6713-6727.
- Yang, Q., Jones, S. W., Parker, C. L., Zamboni, W. C., Bear, J. E. ve Lai, S. K., 2014. Evading immune cell uptake and clearance requires PEG grafting at densities substantially exceeding the minimum for brush conformation, *Molecular Pharmaceutics*, 11, 4, 1250-1258.
- Yang, R., Yang, S. G., Shim, W. S., Cui, F., Cheng, G., Kim, I. W., Kim, D. D., Chung, S. J. ve Shim, C. K., 2009. Lung-specific delivery of paclitaxel by chitosan-modified PLGA nanoparticles via transient formation of microaggregates, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98, 3, 970-984.
- Yang, S. H., Heo, D., Park, J., Na, S., Suh, J. S., Haam, S., Park, S. W., Huh, Y. M. ve Yang, J., 2012. Role of surface charge in cytotoxicity of charged manganese ferrite nanoparticles towards macrophages, *Nanotechnology*, 23,50, 505702.
- Yan, R., Zhang, N., Liu, W., Hu, X., Wang, W., Tang, Y., Wang, S., Wang, X. ve Sheng, Q., 2024. Novel Eu-dipeptide assemblies for a fluorescence sensing strategy to ultrasensitive determine trace sulfamethazine, *Food Chemistry*, 448, 139089.
- Yong, K. T., Wang, Y., Roy, I., Rui, H., Swihart, M. T., Law, W. C., Kwak, S. K., Ye, L., Liu, J., Mahajan, S. D. ve Reynolds, J. L., 2012. Preparation of quantum dot/drug nanoparticle formulations for traceable targeted delivery and therapy, *Theranostics*, 2, 7, 681.
- Yoshimine, S., Kikuchi, E., Kosaka, T., Mikami, S., Miyajima, A., Okada, Y. ve Oya, M., 2013. Prognostic significance of Bcl-xL expression and efficacy of Bcl-xL targeting therapy in urothelial carcinoma, *British Journal of Cancer*, 108, 11, 2312-2320.
- Yuan, H., Huang, X., Li, Q., Luo, C., Lin, C., Zhang, S., Zhang, Y., Yan, Z., Du, N., Liu, Z., Jiang, H. ve Chen, B., 2022. SiRNA-circFARSA-loaded porous silicon nanomaterials for pancreatic cancer treatment via inhibition of CircFARSA expression, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 147, 112672.
- Yu, C., Li, L., Wang, S., Xu, Y., Wang, L., Huang, Y., Hicaw, A., Liu, H. ve Ma, J., 2023. Advances in nanomaterials for the diagnosis and treatment of head and neck cancers: A review, *Bioactive Materials*, 25, 430-444.

- Yue, Z. G., Wei, W., Lv, P. P., Yue, H., Wang, L. Y., Su, Z. G. ve Ma, G. H., 2011. Surface charge affects cellular uptake and intracellular trafficking of chitosan-based nanoparticles, *Biomacromolecules*, 12, 7, 2440-2446.
- Zarovni, N., Corrado, A., Guazzi, P., Zocco, D., Lari, E., Radano, G., Muhhina, J., Fondelli, C., Gavrilova, J. ve Chiesi, A., 2015. Integrated isolation and quantitative analysis of exosome shuttled proteins and nucleic acids using immunocapture approaches, *Methods*, 87, 46-58.
- Zerlinger, E., Barta, T., Li, M. ve Vlassov, A. V., 2015. Strategies for isolation of exosomes, *Cold Spring Harbor Protocols*, 2015, 4, 074476.
- Zhang, D., Qi, G. B., Zhao, Y. X., Qiao, S. L., Yang, C. ve Wang, H., 2015. In situ formation of nanofibers from purpurin18-peptide conjugates and the assembly induced retention effect in tumor sites, *Advanced Materials*, 27, 40, 6125-6130.
- Zhang, M., Jin, K., Gao, L., Zhang, Z., Li, F., Zhou, F. ve Zhang, L., 2018. Methods and technologies for exosome isolation and characterization, *Small Methods*, 2, 9, 1800021.
- Zhang, M., Song, R., Liu, Y., Yi, Z., Meng, X., Zhang, J., Tang, Z., Yao, Z., Liu, Y., Liu, X. ve Bu, W., 2019. Calcium-overload-mediated tumor therapy by calcium peroxide nanoparticles, *Chem*, 5, 8, 2171-2182.
- Zhang, M., Wang, H., Dai, G. C., Lu, P. P., Gao, Y. C., Cao, M. M., Li, Y. J. ve Rui, Y. F., 2024. Injectable self-assembled GDF5-containing dipeptide hydrogels for enhanced tendon repair, *Materials Today Bio*, 26, 101046.
- Zhang, S., 2003. Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly, *Nature Biotechnology*, 21, 10, 1171-1178.
- Zhang, Y., Bi, J., Huang, J., Tang, Y., Du, S. ve Li, P., 2020. Exosome: a review of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted therapy applications, *International Journal of Nanomedicine*, 6917-6934.
- Zhang, Z., Cao, X., Wang, C., Huang, Q., ve Liu, Y., 2024. Nanomaterials in cancer treatment, In *Handbook of Nanomaterials*, 2, 431-472.
- Zhao, F., Zhao, Y., Liu, Y., Chang, X., Chen, C. ve Zhao, Y., 2015. *Small Weinb. Bergstr. Ger.* 2011, 7, 1322. DOI, 10, 961208.
- Zhou, S. L., Matsumoto, S., Tian, H. D., Yamane, H., Ojida, A., Kiyonaka, S. ve Hamachi, I., 2005. pH-responsive shrinkage/swelling of a supramolecular hydrogel composed of two small amphiphilic molecules, *Chemistry–A European Journal*, 11, 4, 1130-1136.
- Zhou, X., Xie, F., Wang, L., Zhang, L., Zhang, S., Fang, M. ve Zhou, F., 2020. The function and clinical application of extracellular vesicles in innate immune regulation, *Cellular & Molecular Immunology*, 17, 4, 323-334.

- Zhu, P. F., Wang, M. X., Chen, Z. L. ve Yang, L., 2021. Targeting the tumor microenvironment: a literature review of the novel anti-tumor mechanism of statins, *Frontiers in Oncology*, 11, 761107.
- Zhu, P., Yan, X., Su, Y., Yang, Y. ve Li, J., 2010. Solvent-induced structural transition of self-assembled dipeptide: from organogels to microcrystals, *Chemistry–A European Journal*, 16, 10, 3176-3183.
- Zou, Q., Abbas, M., Zhao, L., Li, S., Shen, G. ve Yan, X., 2017. Biological photothermal nanodots based on self-assembly of peptide–porphyrin conjugates for antitumor therapy, *Journal of the American Chemical Society*, 139, 5, 1921-1927.
- Zou, Q., Liu, K., Abbas, M. ve Yan, X., 2016. Peptide-Modulated Self-Assembly of Chromophores toward Biomimetic Light-Harvesting Nanoarchitectonics, *Advanced Materials*, 28, 6, 1031-1043.
- Zuckerman, J. E. ve Davis, M. E., 2015. Clinical experiences with systemically administered siRNA-based therapeutics in cancer, *Nature Reviews Drug Discovery*, 14, 12, 843-856.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Burcu ÖNAL ACET

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans : Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, 2010-2015

Yüksek Lisans : Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, 2016-2018

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

Yurt dışı deneyimi

1. Universidad Rey Juan Carlos, Kimya Mühendisliği (Erasmus), Yüksek Lisans, 2017
2. National Academy of Sciences Belarus, KA171 Erasmus Yükseköğretim Öğrenci Staj Programı, 01 Ağustos - 30 Eylül 2022
3. Mainz University, Doktora sırası araştırmacı, TÜBİTAK 2214 - Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı, 29 Temmuz 2023 - 28 Temmuz 2024

Projelerde Yaptığı Görevler

1. “Nanoflower”-sentezi, karakterizasyonu, olası biyoloji ve tıp uygulamaları için biyomoleküller ile etkileşimlerinin incelenmesi, TÜBİTAK ve BRFFR (Belarus Cumhuriyeti Temel Araştırma Vakfı) arasında Uluslararası İkili İşbirliği Projesi, 118Z037, Bursiyer, 2018 (Sonuçlandı), (Uluslararası).
2. “N-Heksanoil Homoserin Lakton Tayinine Yönelik Bir Kuartz Kristal MikroteraziBiyosensör Sisteminin Geliştirilmesi”, TÜBİTAK, Proje No: 119Z184, Bursiyer, 2019, (Sonuçlandı), (Ulusal)

3. “Peptid Biyopolimerik Nanomalzemeler: Sentezi, İşlevselleştirilmesi, Karakterizasyonu ve Kanser Hücrelerine Girebilen Sistemler Olarak Değerlendirilmesi” TÜBİTAK ve BRFFR (Belarus Cumhuriyeti Temel Araştırma Vakfı) arasında Uluslararası İkili İşbirliği Projesi, Proje No: 220N178, Bursiyer, 2021, (Sonuçlandı), (Uluslararası).
4. TÜBİTAK 2214 - Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı, Doktora sırası Araştırmacı, Mainz University, Almanya, 29 Temmuz 2023- 28 Temmuz 2024.

Ödüller

1. 2250- Lisansüstü Bursları Performans Programı – TÜBİTAK, 2022-1 (%100 Desteklenme)
2. 2250- Lisansüstü Bursları Performans Programı – TÜBİTAK, 2023-1 (%100 Desteklenme)
3. 2250- Lisansüstü Bursları Performans Programı – TÜBİTAK, 2023-2 (%100 Desteklenme)

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1. Acet, Ö., Shcharbin, D., Zhogla, V., Kirsanov, P., Halets-Bui, I., Acet, B. Ö., Gök, T., Bryszewska, M. ve Odabaşı, M., 2023. Dipeptide nanostructures: Synthesis, interactions, advantages and biomedical applications, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 222, 113031.
2. Gül, D., Önal Acet, B., Lu, Q., Stauber, R. H., Odabaşı, M. ve Acet, Ö., 2024. Revolution in cancer treatment: how are intelligently designed nanostructures changing the game?, International Journal of Molecular Sciences, 25, 10, 5171.
3. Önal Acet, B., Gül, D., Stauber, R. H., Odabaşı, M., ve Acet, Ö., 2024. A review for uncovering the “Protein-Nanoparticle alliance”: Implications of the protein corona for biomedical applications, Nanomaterials, 14, 10, 823.